

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

Departamento de Cirugía



**EFFECTOS DE LA UTILIZACIÓN DE AGREGADOS DE
NANOHIPOXIAPATITA Y PROTEÍNA SPARC EN UNA
MATRIZ DE COLÁGENO COMO SUSTITUTO ÓSEO.
APLICACIÓN EN UN MODELO ANIMAL.**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Sergio Bartolomé García

Directores:

**Pablo de la Cuadra Virgili
Eduardo Jorge Herrero**

Madrid, 2017

Don Pablo de la Cuadra Virgili, Profesor Asociado de Cirugía Ortopédica y Traumatología de la Universidad Autónoma de Madrid, y Jefe del Sección de Cirugía Ortopédica y Traumatología del Hospital Universitario Puerta de Hierro-Majadahonda de Madrid

CERTIFICA:

Que el presente trabajo titulado **“Efectos de la utilización de agregados de nanohidroxiapatita y proteína SPARC en una matriz de colágeno como sustituto óseo. Aplicación en un modelo animal”** realizado bajo mi dirección por el licenciado don Sergio Bartolomé García, reúne todos los requisitos científicos y formales para proceder a su lectura y defensa como Tesis Doctoral, para optar al grado de Doctor en Medicina.

Y para que conste a todos los efectos oportunos, y a petición del interesado, firmo el presente certificado en Madrid, a 20 de abril de 2017.

Fdo.: Dr. Pablo de la Cuadra Virgili

Don Eduardo Jorge Herrero, Doctor en Ciencias Químicas por la Universidad Complutense de Madrid y Adjunto del Servicio de Cirugía Experimental del Hospital Universitario Puerta de Hierro-Majadahonda de Madrid

CERTIFICA:

Que el presente trabajo titulado “**Efectos de la utilización de agregados de nanohidroxiapatita y proteína SPARC en una matriz de colágeno como sustituto óseo. Aplicación en un modelo animal**” realizado bajo mi dirección por el licenciado don Sergio Bartolomé García, reúne todos los requisitos científicos y formales para proceder a su lectura y defensa como Tesis Doctoral, para optar al grado de Doctor en Medicina.

Y para que conste a todos los efectos oportunos, y a petición del interesado, firmo el presente certificado en Madrid, a 20 de abril de 2017.

Fdo.: Dr. Eduardo Jorge Herrero

A mi familia

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, mi profundo agradecimiento a los directores de esta tesis, el doctor Pablo de la Cuadra Virgili, compañero, amigo y referente en tantas facetas de la vida, y al doctor Eduardo Jorge Herrero. Sin su acertado consejo, firme dirección y apoyo intelectual y moral este trabajo no hubiese visto la luz.

Gracias también a los doctores Alis Yovana Pataquiva y Fernando Jorge Monteiro, del Laboratorio de Materiales del Instituto de Engenharia Biomedica de Oporto, por proporcionarnos el sustituto óseo objeto de este trabajo, y por colaborar en los primeros pasos de su utilización.

Al Dr López Bravo y su equipo del servicio de Anatomía Patológica del Hospital Provincial de Ávila, por el procesamiento y valoración inicial de las muestras histológicas, y por facilitarnos la recuperación de las mismas.

A la Dra Maria Rosario Sánchez Yuste del servicio de Anatomía Patológica del Hospital Universitario Puerta de Hierro-Majadahonda, por realizar el estudio y diagnóstico de todas las muestras histológicas con tanta profesionalidad. Sin su incorporación a este proyecto en un momento de gran dificultad, el mismo no hubiese visto la luz.

A Ana Royuela, del Servio de Bioestadística, por su colaboración en el análisis estadístico de los resultados.

A todos los miembros del Servicio de Cirugía Experimental del Hospital Universitario Puerta de Hierro-Majadahonda que han participado de alguna forma en la fase experimental, por su apoyo, paciencia y comprensión, y muy especialmente a Martín Santos.

A la Dra Ana Crespo, por los consejos y vivencias compartidas.

A todos mis compañeros del Servicio de Cirugía Ortopédica y Traumatología del Hospital Universitario Puerta de Hierro-Majadahonda, por su comprensión y apoyo incondicional. Cuando estás rodeado de amigos todo es más fácil.

A mis maestros y profesores.

A mi hermano Gonzalo, ejemplo, maestro y guía en esta aventura de vivir.

A mis padres Gloria y Gonzalo, por su ejemplo constante de esfuerzo y capacidad de trabajo, y por haberme transmitido el verdadero sentido de la vida. A ellos les debo todo lo que soy.

A los que he olvidado, de manera involuntaria, por ayudarme de una u otra forma a conseguir que esta tesis viese la luz.

A todos ellos mi más sincero agradecimiento.

ÍNDICE

I.- INTRODUCCIÓN	1
1.- PROPÓSITO Y JUSTIFICACIÓN DE ESTE TRABAJO.....	3
2.- DEFINICIONES EN EL CAMPO DE INGENIERÍA TISULAR ÓSEA.....	5
3.- EL TEJIDO ÓSEO	8
3.1.- CONCEPTO.....	8
3.2.- ANATOMÍA Y FUNCIONES DEL HUESO.....	8
3.2.1.- Funciones biológicas.....	9
3.2.1.1.- Hematopoyesis.....	9
3.2.1.2.- Regulación del metabolismo mineral.....	9
3.2.2.- Funciones mecánicas.....	9
3.2.2.1.- Soporte y estabilidad mecánica.....	10
3.2.2.2.- Protección para órganos vitales.....	10
3.2.2.3.- Locomoción y movilidad del organismo.....	10
3.3.- ESTRUCTURA DEL TEJIDO ÓSEO.....	11
3.3.1.- Estructura macroscópica del hueso.....	11
3.3.2.- Estructura microscópica del hueso.....	12
3.3.2.1.- Hueso cortical.....	14
3.3.2.2.- Hueso trabecular.....	15
3.3.2.3.- Periostio.....	16
3.3.2.4.- Endostio.....	17
3.4.- COMPOSICIÓN DEL HUESO	17
3.4.1.- Células óseas.....	17
3.4.1.1.- Línea osteoformadora.....	17
3.4.1.2.- Línea destructora de hueso.....	20
3.4.1.3.- Células madre.....	22
3.4.2.- Componente orgánico.....	22
3.4.2.1.- Colágeno	23
3.4.2.2.- Proteínas no colagenosas.....	24
3.4.3.- Componente inorgánico y agua.....	27
3.4.4.- Mineralización de la matriz osteoide.....	28
3.5.- PROCESO DE OSIFICACIÓN. OSTEOGÉNESIS.....	29
3.5.1.- Tipos de osificación	30
3.5.2.- Factores que influyen en el proceso de osificación.....	31
3.6.- REGENERACIÓN ÓSEA: MODELADO Y REMODELADO ÓSEO	32

3.6.1.- Biología de la regeneración ósea.....	35
3.7.- CONSOLIDACIÓN ÓSEA.....	37
2.7.1.- Tipos de consolidación ósea.....	37
3.7.2.- Factores que influyen en la consolidación de las fracturas.	39
4.- SUSTITUTOS ÓSEOS: INJERTOS Y BIOMATERIALES.	40
4.1.- INJERTOS ÓSEOS.....	40
4.1.1.- Biología y biomecánica de los injertos óseos.....	41
4.1.2.- Tipos de injertos óseos.	42
4.1.3.- Los procesos biológicos de incorporación del injerto.....	46
4.2.- BIOMATERIALES O SUSTITUTOS ÓSEOS.....	48
4.2.1.- Biomateriales inorgánicos.	49
4.2.1.1.- Aleaciones metálicas (biomateriales inorgánicos metálicos).....	49
4.2.1.2.- Materiales cerámicas (biomateriales inorgánicos no metálicos).....	51
4.2.1.3. HIDROXIAPATITA A ESCALA NANOMÉTRICA COMO SUSTITUTO ÓSEO	56
4.2.2.- Biomateriales orgánicos.	61
4.2.2.1.- No reabsorbibles.....	61
4.2.2.2.- Reabsorbibles o biodegradables. COLÁGENO	62
4.3.- NANOCOMPUESTOS DE HIDROXIAPATITA Y COLÁGENO COMO SUSTITUTOS ÓSEOS.	69
4.3.1.- Aplicaciones actuales de los compuestos de colágeno e hidroxiapatita..	72
4.3.2.- Métodos de síntesis de compuestos de colágeno-HA.	73
4.3.3.- Ligandos de unión de los compuestos colágeno-HA.	75
4.3.4.- Resultados experimentales de sustitutos óseos de colágeno-HA.....	76
II.- OBJETIVOS.....	79
III.- MATERIAL Y METODOLOGÍA.....	83
1.- OBTENCIÓN Y PREPARACIÓN DEL BIOCOMPUESTO Y RESTO DE SUSTITUTOS IMPLANTADOS.....	85
2.- ESTRUCTURA DE TRABAJO	89
3.- MODELO EXPERIMENTAL	92
3.1.- LOCALIZACIÓN	92
3.3.- ANESTESIA Y PREPARACIÓN PREQUIRÚRGICA.....	94

3.4.- TÉCNICA QUIRÚRGICA	94
3.5.- CUIDADOS POSTOPERATORIOS.....	96
4.- ESTUDIOS REALIZADOS	98
4.1.- ESTUDIO HISTOLÓGICO.....	98
4.2.- ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	104
IV.- RESULTADOS	107
1.- RESULTADOS CLÍNICOS	109
2.- RESULTADOS MACROSCÓPICOS	109
3.- RESULTADOS HISTOLÓGICOS.....	110
3.1.- CONTROLES NO IMPLANTADOS.....	110
3.2.- IMPLANTES SUBCUTÁNEOS	111
3.2.1.- Implantes subcutáneos de colágeno I/III.....	111
3.2.2.- Implantes subcutáneos del biocompuesto colágeno I/III, nanoHA y proteína SPARC	113
3.3.- IMPLANTES INTRAÓSEOS	115
3.3.1.- Grupo 2: generación de defecto óseo sin aporte de ningún sustituto....	115
3.3.2.- Grupo 3: defecto óseo relleno de colágeno I/III.....	116
3.3.3.- Grupo 4: relleno del defecto óseo con hidroxiapatita comercial Engipore®.	118
3.3.4.- Grupo 1: biocompuesto de colágeno I/III, nanoHA y proteína SPARC	119
V.- DISCUSIÓN.....	133
1.- SITUACIÓN ACTUAL	135
2.- MATERIALES EMPLEADOS EN INGENIERÍA TISULAR ÓSEA.....	136
2.1.- HIDROXIAPATITA.....	136
2.2.- COLÁGENO.....	137
2.3.- COMPUESTOS DE COLÁGENO-HIDROXIAPATITA.....	138
2.4.- LIGANDOS DE COLÁGENO-HIDROXIAPATITA: PROTEÍNA SPARC	141
3.- MODELO EXPERIMENTAL UTILIZADO.....	142
4.- DISCUSIÓN DE RESULTADOS.	144
4.1.- RESULTADOS MACROSCÓPICOS.....	144
4.2.- RESULTADOS HISTOLÓGICOS.....	145

4.2.1.- Muestras no implantadas y subcutáneas.....	145
4.2.2.- Muestras intraóseas	147
5.- FUTURO DE LA INGENIERÍA TISULAR	150
6.- LIMITACIONES	152
 VI.- CONCLUSIONES	 155
 VII.- RESUMEN	 159
1.- INTRODUCCIÓN.	160
2.- HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	161
3.- MATERIAL Y MÉTODOS	161
4.- RESULTADOS	162
5.- CONCLUSIONES	162
 VIII.-BIBLIOGRAFÍA	 165

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Esquema de la estructura macroscópica del hueso.	12
Figura 2: Esquema morfológico de la estructura ósea: hueso cortical y trabecular.	15
Figura 3: Esquema de hueso trabecular.	16
Figura 4: Imagen de osteoblastos.	18
Figura 5: Imagen de osteocitos. Tinción con HE.	19
Figura 6: Imagen de osteoclastos y osteoblastos. Tinción con HE.	21
Figura 7: Activación del osteoclasto.	22
Figura 8: Estructura helicoidal del colágeno.	24
Figura 9: Osificación intramembranosa	30
Figura 10: Remodelación ósea.	34
Figura 11: Fase de hematoma o inflamación. Consolidación ósea.....	37
Figura 12: Fase reparadora o callo blando. Consolidación ósea.	38
Figura 13: Fase de callo duro. Consolidación ósea.	39
Figura 14: Fase de remodelado. Consolidación ósea.	39
Figura 15: Estructura ósea a diferentes escalas.	70
Figura 16: Tipos de anclajes de nanopartículas en una cadena polimérica.....	76
Figura 17: Muestras en forma de cilindro para su implantación intraósea.....	87
Figura 18: Muestras esterilizadas previas a su implantación.	87
Figura 19: Representación esquemática de la síntesis del compuesto de colágeno I/III, nanoHA y SPARC de este estudio.	88
Figura 20: Andamios de colágeno tipo I/III obtenidos mediante la técnica descrita por el equipo de Oporto.	89
Figura 21: Hidroxiapatita comercial (Engipore®)	89
Figura 22: Esquema de la primera fase del estudio.....	90
Figura 23: Esquema de la segunda fase del estudio.....	90
Figura 24: Quirófano de Cirugía Experimental del Hospital Puerta de Hierro-Majadahonda donde se desarrollaron las intervenciones	92
Figura 25: Rata Wistar de 8 semanas de vida.....	93
Figura 26: Animalario de Cirugía Experimental del Hospital Universitario Puerta de Hierro.....	93
Figura 27: a) Cámara para la inducción anestésica; b) Mantenimiento anestésico con mascarilla y bomba de calor constante; c) Morfina subcutánea prequirúrgica.	94
Figura 28: a) Preparación del campo quirúrgico con solución yodada, tras rasurado de piel; b) Incisión cutánea.....	95

Figura 29: a) Luxación lateral de rótula tras abordaje pararrotuliano interno; b) Fresado progresivo con agujas tipo Abbocath.	95
Figura 30: a) Defecto óseo femoral distal preparado para la implantación; b) Cilindro de biocompuesto en el momento de su implantación en el lecho receptor.	96
Figura 31: a) Cierre de artrotomía; b) Cierre de piel.....	96
Figura 32: a) Fémur completo de rata tras su extracción; b) Detalle de lugar de implantación de muestra intraósea a nivel del fémur distal.....	97
Figura 33: Implantación de colágeno I/III + nanoHA a los 30 días, donde se aprecia la maduración progresiva del tejido neoformado. Tinción de tricrómico de Masson.....	99
Figura 34: Implantación de colágeno I/III + nanoHA a los 30 días. Tinción por impregnación argéntica de reticulina (RET).	99
Figura 35: Implantación de colágeno I/III + nanoHA a los 30 días. Tinción con ácido peryódico de Schiff (PAS).....	100
Figura 36: Colágeno I/III + nanoHA sin implantar. A la izquierda tinción de HE. A la derecha tinción con técnica de Von Kossa.	100
Figura 37: Hueso compacto neoformando en un defecto óseo sustituido por el biocompuesto de col I/III + nanoHA a los 15 días de su implantación, en el que pueden apreciarse los canales de Havers con la disposición de laminillas óseas a su alrededor. Tinción de HE.....	101
Figura 38: Hueso trabecular neoformando en un defecto óseo sustituido por el biocompuesto de col I/III + nanoHA a los 60 días. Tinción de HE.	102
Figura 39: Aspecto de HA comercial en gránulos que aún no se ha reabsorbido con la presencia de trabéculas óseas neoformadas bordeando a los mismos a los 15 días de su implantación. Tinción de HE.....	103
Figura 40: Defecto condral persistente en el punto de entrada del fresado intramedular a los 60 días de la implantación.....	109
Figura 41: Colágeno I/III sin implantar. A la izquierda tinción de HE. A la derecha tinción con tricrómico de Masson	110
Figura 42: Colágeno I/III + nanoHA sin implantar. A la izquierda tinción de HE. A la derecha tinción con técnica de Von Kossa	111
Figura 43: Formación de células gigantes a cuerpo extraño tras la implantación de colágeno I/III sin nanoHA. 5 días tras la implantación. Tinción de HE.....	112
Figura 44: Implantación de colágeno I/III sin nanoHA. A poco aumento y con tinción HE se aprecia la presencia de una fina cápsula y ya se adivinan dos tipos de fibras en relación al grosor al presentar los dos colágenos I y III lo que vuelve a repetirse con el tricrómico de Masson (derecha).	112
Figura 45: Izquierda: proliferación fibroblástica tras implantación subcutánea de colágeno I/III sin nanoHA a los siete días. Tinción de HE. Derecha: proliferación de	

fibras de colágeno y reticulina tras implantación subcutánea de colágeno I/III sin nanoHA a los siete días. Tinción con impregnación argéntica de Reticulina (RET)... 113	113
Figura 46: Reacción inflamatoria perimplante en una muestra de colágeno I/III con nanoHA a los cinco días de su implantación. A la derecha fagocitosis (flecha). Tinción con HE..... 113	113
Figura 47: Reacción inflamatoria perimplante en una muestra de colágeno I/III con nanoHA a los 15 días de su implantación, con una gran respuesta fibrótica y cicatricial. A la derecha puede verse la proliferación fibrovascular y reacción a cuerpo extraño. Tinción con HE..... 114	114
Figura 48: Reacción inflamatoria perimplante en una muestra de colágeno I/III con nanoHA a los 15 días de su implantación, con una gran respuesta fibrótica y cicatricial. Tinción tricrómico de Masson..... 114	114
Figura 49: Defecto óseo sin relleno (sólo fresado) a los 15 días. Tinción de HE 115	115
Figura 50: Defecto óseo sin relleno (sólo fresado) a los 60 días. Tinción de HE 116	116
Figura 51: Defecto óseo relleno con colágeno I/III a los 15 días. Tinción de HE 116	116
Figura 52: Defecto óseo relleno con colágeno I/III a los 30 días. Tinción de HE 117	117
Figura 53: Defecto óseo relleno con colágeno I/III a los 60 días. Tinción de HE a la izquierda, y de PAS a la derecha. 117	117
Figura 54: Defecto óseo relleno con hidroxiapatita comercial (Engipore®) a los 15 días. Tinción de HE..... 118	118
Figura 55: Defecto óseo relleno con hidroxiapatita comercial (Engipore®) a los 30 días. Tinción de HE..... 119	119
Figura 56: Defecto óseo relleno con hidroxiapatita comercial (Engipore®) a los 60 días. Tinción de HE..... 119	119
Figura 57: Defecto óseo relleno con colágeno I/III, nanoHA y proteína SPARC a los 15 días. Puede observarse la presencia de hueso compacto y médula ósea hematopoyética. Tinción de HE..... 120	120
Figura 58: Defecto óseo relleno con colágeno I/III, nanoHA y proteína SPARC a los 15 días. Pueden apreciarse osteoblastos (A), osteoclastos (B), fibras colágenas del biocompuesto (C) y matriz ósea (D). Tinción de HE. 121	121
Figura 59: Defecto óseo relleno con colágeno I/III, nanoHA y proteína SPARC a los 30 días. Tinción de HE 121	121
Figura 60: Defecto óseo relleno con colágeno I/III, nanoHA y proteína SPARC a los 30 días. Hueso compacto denso de la zona subcondral, que corresponde con la zona circular de la figura 59. Tinción de HE. 122	122
Figura 61: Defecto óseo relleno con colágeno I/III, nanoHA y proteína SPARC a los 30 días. Visión panorámica de la zona de implantación. A la derecha se localizan diferentes áreas que serán explicadas a continuación. Tinción de HE. 122	122

Figura 62: Defecto óseo relleno con colágeno I/III, nanoHA y proteína SPARC a los 30 días. Detalle del área 1 de la figura 61. Tinción HE.....	123
Figura 63: Defecto óseo relleno con colágeno I/III, nanoHA y proteína SPARC a los 30 días. Detalle del área 2 de la figura 61. Tinción HE.....	123
Figura 64: Defecto óseo relleno con colágeno I/III, nanoHA y proteína SPARC a los 30 días. Detalle del área 3 de la figura 61. Tinción HE.....	124
Figura 65: Defecto óseo relleno con colágeno I/III, nanoHA y proteína SPARC a los 30 días. Detalle del área 4 de la figura 61. Tinción HE.....	124
Figura 66: Defecto óseo relleno con colágeno I/III, nanoHA y proteína SPARC a los 60 días. Hueso compacto denso. Médula hematopoyética con adipocitos. Tinción de HE.	125
Figura 67: Representación gráfica de la mediana de los parámetros estudiados a los 15 días de implantación en los diferentes grupos.	127
Figura 68: Representación gráfica de la mediana de los parámetros estudiados a los 30 días de implantación en los diferentes grupos.	128
Figura 69: Representación gráfica de la mediana de los parámetros estudiados a los 60 días de implantación en los diferentes grupos.	129
Figura 70: Representación gráfica mediante diagramas de cajas y bigotes del grado de madurez ósea	130
Figura 71: Representación gráfica mediante diagramas de cajas y bigotes de la presencia de médula ósea.....	130
Figura 72: Representación gráfica mediante diagramas de cajas y bigotes de la continuidad del defecto-hueso normal.....	131
Figura 73: Representación gráfica mediante diagramas de cajas y bigotes de la formación ósea periférica.	132

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Conceptos utilizados en ingeniería tisular ósea.....	7
Tabla 2: Tipos de articulaciones.....	11
Tabla 3: Diferencias en organización y función de ambos tipos de hueso.....	13
Tabla 4: Composición de la matriz orgánica.....	23
Tabla 5: Proteínas no colagenosas de la matriz.....	25
Tabla 6: Factores hormonales y su efecto sobre el hueso.....	36
Tabla 7: Efectos de los factores de crecimiento sobre el hueso.	36
Tabla 8: Factores locales y sistémicos que influyen en la consolidación ósea.....	40
Tabla 9: Clasificación de los injertos óseos.....	44
Tabla 10: Características biológicas y mecánicas de los injertos óseos.....	45
Tabla 11: Factores locales y sistémicos que intervienen en la incorporación del injerto.....	47
Tabla 12: Características del sustituto óseo ideal.....	49
Tabla 13: Aleaciones metálicas utilizadas en la actualidad.....	51
Tabla 14: Comparación de las características mecánicas del hueso humano y de las biocerámicas	55
Tabla 15: Sustitutos óseos cerámicos en cirugía ortopédica y traumatología.	55
Tabla 16: Métodos de fabricación de partículas de nanoHA.....	58
Tabla 17: Métodos de procesamiento de nanoHA.....	60
Tabla 18: Tipos de colágeno y su distribución en el organismo	63
Tabla 19: Propiedades del colágeno como sustituto óseo	66
Tabla 20: Métodos físicos y químicos utilizados para el entrecruzamiento del colágeno en la bibliografía.....	69
Tabla 21: Principales métodos de síntesis de compuestos de colágeno-nanoHA	74
Tabla 22: Comparación de experimentos <i>in vivo</i> con diferentes compuestos colágeno-HA	77
Tabla 23: Características del compuesto de colágeno I/III, nanoHA y SPARC de este estudio.....	87
Tabla 24: Tabla resumen del número de animales y de muestras distribuidas por grupos y por tiempos de duración de implantación.....	91
Tabla 25: Animales distribuidos por grupos y tiempos, con su fecha de implantación y de retirada. Implantes intraóseos.	91
Tabla 26: Escala de puntuación numérica asignada a cada uno de los parámetros histológicos siguiendo el modelo propuesto por Heiple.....	104
Tabla 27: Resultados histológicos de las muestras intraóseas valoradas. M: mediana.	125

Tabla 28: Resultados del modelo de valoración morfológico de Heiple en las distintas muestras.	126
Tabla 29: Tabla de comparación dos a dos con significación estadística a los 15 días de implantación.	128
Tabla 30: Comparación de trabajos publicados <i>in vivo</i> con diferentes compuestos colágeno-HA, y el compuesto de nuestro trabajo.....	150

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

- AINE: Antiinflamatorio no esteroideo.
- AP: Anatomía patológica.
- BMP: *Bone morphogenetic proteins*, proteínas morfogenéticas óseas. Péptidos de bajo peso molecular con una función esencial en el proceso de osteoinducción.
- BMU: *Bone multicellular unit*, en terminología inglesa. Unidad básica multicelular, en el proceso de regeneración.
- BRU: *Bone remodelling unit*, en terminología inglesa. Unidad ósea de remodelación, en el proceso de remodelación ósea.
- BSU: *Bone structural unit*, en terminología inglesa. Unidad estructural ósea, en el proceso de remodelado óseo.
- CrCo: Aleación metálica de cromo y cobalto.
- DBM: *Demineralized bone matrix*, en terminología inglesa. Matriz ósea desmineralizada.
- DHT: tratamiento deshidrotérmico. Método físico de entrecruzamiento empleado en la síntesis de los andamios de colágeno.
- FGF: *Fibroblastic growing factor*, en terminología inglesa. Factores de crecimiento fibroblástico.
- GH: *Growing factor*, en terminología inglesa. Hormona del crecimiento.
- GPa: gigapascales.
- HA: Hidroxiapatita.
- HE: Tinción de hematoxilina-eosina, empleada rutinariamente para el análisis histológico de muestras.
- HPA: Hospital Provincial de Ávila.

- HUPHM: Hospital Universitario Puerta de Hierro-Majadahonda.
- IGF-I y II: *Insulin growing factor*, en terminología inglesa. Factores de crecimiento análogos a insulina.
- MOD: Matriz ósea desmineralizada.
- MPa: megapascuales.
- MSC: *Mesenchymal Stem Cells*, en terminología inglesa. Células madre o células progenitoras de origen mesenquimal.
- NanoHA: Hidroxiapatita con un tamaño nanométrico. También nHA.
- OPG: Osteoprotegerina.
- PAS: Acido peryódico de Schiff (PAS). Tipo de tinción histológica para la detección de glucógeno.
- PBMA: Polibutylmetacrilato.
- PDGF: *Platelet-Derived Growth Factor*, en terminología inglesa. Factor de crecimiento derivado de las plaquetas.
- PE: Polietileno.
- PMMA: Polimetilmetacrilato. Cemento óseo acrílico empleado en cirugía ortopédica.
- PTH: Hormona paratiroidea.
- RANK: Receptor activador del factor nuclear kappa. Presente en el proosteoclasto.
- RANKL: Ligando del RANK
- RET: Impregnación argéntica de Reticulina. Tipo de tinción histológica para detectar colágeno y fibras de reticulina.
- SBF: *Synthetic body fluid*, en terminología inglesa. Fluidos corporales sintéticos.

- SDS: Dodecilsufato sódico ($C_{12}H_{25}NaO_4S$): Surfactante iónico
- SPARC: *Secreted Protein Acidic and Rich in Cysteine*, también llamada osteonectina o BM40.
- TCP: *Tricalcium phosphate*, en terminología inglesa. Fosfato tricálcico.
- TGF- α y β : *Transforming growth factor*, en terminología inglesa. Factor de crecimiento transformante.

I.- INTRODUCCIÓN

1.- PROPÓSITO Y JUSTIFICACIÓN DE ESTE TRABAJO.

La utilización de injerto óseo es un procedimiento habitual dentro del campo de la Cirugía Ortopédica y Traumatología, así como en la Neurocirugía y la Cirugía Oral y Maxilofacial. Con frecuencia es necesario añadir injerto para inducir la formación de hueso en áreas que se han estabilizado quirúrgicamente mediante dispositivos metálicos (fracturas metafisarias, artrodesis vertebrales) o en cirugías de revisión articular después de procesos infecciosos o tumorales con gran destrucción ósea. Las limitaciones que asocia la obtención de dicho injerto óseo, tanto el autoinjerto del propio individuo como el aloinjerto de otros individuos de la misma especie, ha generado en las últimas décadas un creciente interés por el estudio y desarrollo de diferentes biomateriales que puedan mimetizar sus funciones biológicas y mecánicas. Se calcula que este emergente mercado genera anualmente más de 2000 millones de euros ⁽⁵⁾.

La hidroxiapatita (HA) es uno de los biomateriales más estudiados y empleados para la regeneración ósea por ser un elemento esencial de la arquitectura ósea^(56, 187). Son muchos los estudios que han probado la capacidad osteoconductora de la HA de síntesis a lo largo de estas últimas décadas^(163, 180, 187, 208), empleando diversas formulaciones químicas y físicas. Además la HA se ha empleado como transportador de sustancias debido a su biocompatibilidad y biodegradación^(28, 47, 288). En los últimos años se ha suscitado un creciente interés en los compuestos de HA sintética con un tamaño nanométrico (nanoHA), ya que se ha visto que esta formulación puede facilitar e incrementar la formación de nuevo tejido óseo, aumentando la adhesión de osteoblastos (células formadoras de hueso), su proliferación, osteointegración y deposición de mineral cálcico en su superficie^(96, 161, 180, 208, 239). De hecho, la HA con una formulación nanométrica es uno de los principales componentes del tejido óseo natural, por lo que puede ser utilizada directamente en el proceso de regeneración ósea⁽¹⁵³⁾.

Por otra parte, el colágeno reconstituido, aislado de diversos tejidos y procedencias, ha demostrado sus excelentes cualidades actuando como sistema de transporte para macromoléculas tales como las proteínas morfogenéticas óseas (BMPs) y otros factores de crecimiento empleados en el remodelado óseo^(51, 206). Cuando se asocia el colágeno con partículas de HA se forman biocompuestos que presentan unas

propiedades mecánicas y osteoconductoras superiores a los materiales empleados de manera aislada⁽¹¹³⁾. Una de las principales limitaciones durante la fase de procesamiento de estos compuestos es el método de unión de los cristales de nanoHA con la red de colágeno, y que esta unión no sea únicamente física. La pérdida de la adherencia entre ambos componentes puede resultar en un fallo precoz del compuesto y en una disminución de sus propiedades mecánicas.

La glicoproteína SPARC (*Secreted Protein Acidic and Rich in Cysteine*), también llamada osteonectina o BM40, desempeña un importante papel en diferentes procesos del metabolismo del hueso, como la morfogénesis ósea, y la migración y proliferación celular durante el remodelado óseo⁽³⁴⁾. Se ha demostrado que la glicoproteína SPARC se expresa por células madre mesenquimales y osteoblastos cuando inician el proceso de la osificación endocrinal⁽²¹⁵⁾. Presenta una alta afinidad de unión con el colágeno tipo I, calcio e hidroxiapatita, debido a la presencia de dos sitios de unión de alta afinidad y doce sitios de baja afinidad con el calcio^(75, 125, 238). La SPARC se une al colágeno para mediar y facilitar el depósito de hidroxiapatita⁽²⁰⁹⁾.

En este trabajo se presentan los resultados experimentales de la utilización de un nuevo compuesto formado a partir del procesamiento de hidroxiapatita con una formulación nanométrica y colágeno I/III de origen porcino, utilizando la glicoproteína SPARC como ligando. Se eligió la proteína SPARC para posibilitar una unión química entre la nanoHA y las fibrillas de colágeno, consiguiendo de esta manera el único nanocompuesto desarrollado hasta la fecha empleando esta proteína puente. Se ha evaluado la capacidad osteoconductora y osteoinductora del mismo, para poder ser utilizado en el proceso de regeneración ósea. Para ello se realizó un estudio experimental en ratas Wistar, implantando este biomaterial de forma subcutánea e intraósea para valorar su tolerabilidad y capacidad para acelerar el crecimiento óseo.

2.- DEFINICIONES EN EL CAMPO DE INGENIERÍA TISULAR ÓSEA.

El término “Ingeniería Tisular” fue utilizado por primera vez en el año 1987 durante un congreso de la National Science Foundation. Se definió como la aplicación de métodos y principios de ingeniería en las ciencias de la vida, delimitando un campo de investigación multidisciplinario destinado a desarrollar sustitutos biológicos eficaces capaces de restaurar y/o optimizar parcial o totalmente la función normal de un tejido⁽²⁴³⁾. Posteriormente, Reddi en 1998 la definió como la “ciencia del diseño y fabricación de nuevos tejidos para el restablecimiento funcional de órganos alterados y la sustitución de estructuras dañadas por traumatismos o enfermedades”⁽²⁵⁷⁾.

A continuación se realiza una breve descripción de los términos más utilizados en el campo de los biomateriales y sustitutos óseos empleados en la ingeniería tisular ósea ^(81, 172).

Concepto	Definición
Autoinjerto	Corresponde a tejido transferido de una localización anatómica a otra en un mismo individuo, y habitualmente se considera el patrón de referencia en el caso del injerto óseo. El autoinjerto es osteogénico, osteoinductor y osteoconductor.
Alloinjerto	Corresponde a tejido obtenido de cadáver, procesado y posteriormente implantado en otro individuo de la misma especie. Se trata del sustituto óseo usado con más frecuencia. El procesamiento realizado antes de la implantación ayuda a disminuir su potencial inmunogénico. Estos procesos de modificación incluyen la congelación, la liofilización, la irradiación y la modificación química.
Xenoinjerto	Injerto empleado de una especie diferente que el huésped receptor.
Funciones de los injertos óseos	La actividad biológica de un injerto óseo en el huésped es la resultante de dos funciones intrínsecas: su capacidad osteogénica y sus características mecánicas. La regeneración ósea precisa de tres procesos diferentes: osteoinducción, osteoconducción y reclutamiento de células osteogénicas.
Osteogénesis	Proceso fisiológico por el cual las células del injerto o del huésped sintetizan hueso nuevo. Esta capacidad de neoformación ósea es exclusiva de los osteoblastos. Las células más superficiales, que sobreviven tras un trasplante de hueso cortical o esponjoso, pueden producir hueso nuevo. Este hueso recién formado es importante en las fases iniciales, durante la

	incorporación precoz del injerto, para el desarrollo del callo.
Osteoinducción	Dícese de la capacidad de formación de hueso estimulando el lecho receptor del huésped para que sintetice hueso nuevo. Las células madre mesenquimales atraídas a la zona de actividad se diferencian inicialmente para convertirse en células cartilaginosas y, posteriormente, en células formadoras de hueso u osteoblastos ^(252, 253) . Para que se realice todo este proceso, estudiado en profundidad, son imprescindibles una serie de proteínas derivadas del injerto que son las que dirigen activamente el mismo. Destacan dentro de este grupo las proteínas morfogenéticas óseas (BMP, <i>bone morphogenetic proteins</i>). Las BMP más activas en hueso son la BMP-2, BMP-4 y BMP-7. Estas proteínas desempeñan un papel destacado en la diferenciación de las células madre hasta osteoblastos y por tanto tienen gran importancia en la consolidación de las fracturas y en la remodelación ósea. Las BMP están presentes, hasta cierto grado, en cualquier hueso, siempre y cuando éste se haya conservado utilizando alguno de los procedimientos que evitan su destrucción.
Osteoconducción	Capacidad de proporcionar una configuración tridimensional para la penetración en el injerto de los capilares, tejido perivascular y células osteoprogenitoras desde el huésped ⁽³⁹⁾ . Todos los injertos, así como algunos biomateriales como la HA, son osteoconductores.
Biocompatibilidad	Dícese de la propiedad de un determinado compuesto o material por la que es biológicamente tolerado por el organismo receptor, de tal manera que no se produzcan reacciones no deseadas en la superficie de contacto tejido-material, y que mantenga sus prestaciones durante el tiempo que tenga que cumplir su función.
Biomateriales	Materiales implantables en un organismo vivo, y pueden ser tanto naturales como artificiales. Deben ser biológicamente compatibles con el organismo, y tienen como función reparar o reemplazar un tejido natural dañado. Son los componentes de los implantes utilizados en biomedicina. Atendiendo a la naturaleza del material con el que se fabrica el implante los biomateriales artificiales se pueden clasificar en materiales de origen biológico, metálicos, poliméricos, cerámicos o materiales compuestos.
Biomateriales metálicos	El número de metales empleados en la fabricación de implantes es muy limitado. Únicamente una docena de ellos se utilizan en aplicaciones médicas. Se emplean en forma de aleaciones siendo las más habituales las de acero inoxidable, cromo-cobalto y las aleaciones de titanio, con pequeñas trazas de otros metales. Deben cumplir una serie de requisitos como son la tolerancia por parte del organismo, y la buena resistencia a la corrosión. Suelen emplearse en la fabricación de implantes que tienen que soportar cargas, como ocurre en las prótesis de cadera o de rodilla.
Biomateriales poliméricos	Materiales ampliamente empleados en la clínica debido a sus múltiples posibilidades. Pueden ser naturales y sintéticos, y en ambos casos presentar formulaciones bioestables (con carácter permanente), útiles para sustituir parcial o totalmente tejidos u órganos lesionados o destruidos, y biodegradables (con carácter temporal), con una función adecuada durante un tiempo limitado. Dentro del campo de la cirugía ortopédica se

	encuentran entre los biomateriales poliméricos más utilizados el cemento óseo o polimetilmetacrilato (PMMA) empleado para la fijación de implantes articulares y para relleno de cavidades óseas; y el polietileno, empleado como superficie articular debido a su bajo coeficiente de fricción con los empleados en la actualidad. Entre los materiales poliméricos biodegradables destacan el ácido poliláctico, el ácido poliglicólico, las polisulfonas y los poliortoésteres, que son empleados como materiales de osteosíntesis y como dispensadores de fármacos o de factores de crecimiento.
Biomateriales cerámicos	Conjunto de materiales inorgánicos fabricados mediante procesamiento a altas temperaturas, y cuya estructura contiene elementos metálicos y no metálicos de uniones en un estado oxidado. Se incluyen en este grupo materiales biológicamente estables (inertes) como el óxido de aluminio o el de circonio, y otros más inestables y degradables como el biovidrio y el fosfato tricálcico. La principal ventaja de las biocerámicas es su baja reactividad química, lo que las hace casi inertes, y por ello biocompatibles. Desde un punto de vista mecánico se caracterizan por una gran resistencia a la compresión, así como por ser quebradizos y frágiles (fallo sin deformación plástica). Dentro de los materiales cerámicos se incluye la hidroxiapatita ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$), empleada entre otros usos como recubrimiento de las superficies de los implantes protésicos debido a sus propiedades de cerámica bioactiva, que con posterioridad estudiaremos en profundidad ya que es la base de nuestro trabajo.
Biocompuesto o material biocompuesto	Biomaterial formado por la combinación mecánica, física y/o química de otros biomateriales para mejorar de esta forma sus propiedades. Habitualmente se trata de la inclusión de un material fibrilar en una matriz constituida por otro. En este trabajo se utilizará un biocompuesto de nanohidroxiapatita, colágeno y proteína SPARC.
Bioactividad	Capacidad de un material para posibilitar una respuesta biológica específica en su superficie favoreciendo la formación de un enlace entre los tejidos propios y dicho material.
Materiales ortobiológicos	Dícese de los biomateriales que tienen una función en el campo de la cirugía ortopédica.
Sustituto óseo	Término general empleado para describir cualquier biomaterial, de origen natural o sintético, utilizado para ayudar a la regeneración ósea o para estimular la formación de hueso.
Andamiaje (<i>Scaffolding</i>), soporte o matriz artificial extracelular	Estructura tridimensional utilizada en el campo de los biomateriales y la ingeniería tisular para la regeneración de tejidos. Este soporte o estructura tiene la función de facilitar el proceso de proliferación, diferenciación y síntesis de nuevas células durante la neoformación y sustitución por parte del receptor. De esta manera la medicina regenerativa puede ser clasificada según la utilización o no de estos andamios como soporte. Hablamos de ingeniería tisular cuando se utilizan estas matrices artificiales, y de terapia celular en los casos en los que no se emplea ⁽¹¹⁷⁾ .

Tabla 1: Conceptos utilizados en ingeniería tisular ósea.

3.- EL TEJIDO ÓSEO

La ingeniería tisular ósea se basa en la comprensión de la estructura, la función, la mecánica, la formación y la regeneración del tejido óseo, ya que pretende inducir nuevo tejido óseo funcional. Es por ello necesario entender los mecanismos de formación ósea así como la manera en que este tejido se repara o regenera para el desarrollo de nuevos y mejores biomateriales que mimeticen la naturaleza ósea.

3.1.- CONCEPTO.

“Hueso, del latín *ossum*: cada una de las partes duras que forman el esqueleto de los vertebrados⁽¹⁷⁾”. Atendiendo a la definición del diccionario de la Real Academia Española de la Lengua, el hueso es por tanto el elemento básico, cada una de las piezas que componen el esqueleto, órgano propio de los animales vertebrados. Se trata del elemento diferenciador dentro del reino animal, ya que el estudio del mismo comienza con la dicotomía entre animales vertebrados e invertebrados. No obstante, a pesar de que el esqueleto está fundamentalmente constituido por tejido óseo, no hay que olvidar que tendones, ligamentos y cartílago también forman parte del aparato locomotor y colaboran en las funciones y forma de este.

El tejido óseo constituye un órgano duro y rígido debido a su alta composición en sustancias minerales, fundamentalmente calcio, en forma de fosfatos y carbonatos distribuidos a lo largo de una matriz orgánica. A pesar de este alto contenido en sustancias inorgánicas, la característica fundamental del tejido óseo es que se trata de un tejido vivo, con presencia de circulación sanguínea y el consiguiente intercambio de sustancias hacia y desde el hueso, lo que permite el crecimiento, recambio, remodelado y resorción en función de las necesidades del individuo. Además, como tejido vivo que es, el hueso es una forma altamente especializada de tejido conectivo compuesta por grandes cantidades de matriz extracelular, proteínas intracelulares y proteoglicanos, que mantienen el tejido óseo cohesionado.

3.2.- ANATOMÍA Y FUNCIONES DEL HUESO.

El esqueleto humano está compuesto por 206 huesos, cada uno de los cuales se forma mediante un proceso denominado “modelado óseo”, y se ven sometidos a un proceso de renovación constante conocido como “remodelado óseo”. Dicho remodelado

desempeña un papel vital en la homeostasis mineral y además proporciona un mecanismo para preservar la solidez de los huesos al sustituir el hueso viejo por nuevo hueso mecánicamente sólido.

El esqueleto humano puede considerarse como un prototipo de multifuncionalidad, estructurando las mismas en dos grandes grupos: funciones biológicas y funciones mecánicas.

3.2.1.- Funciones biológicas.

3.2.1.1.- Hematopoyesis.

La hematopoyesis es el mecanismo fisiológico responsable de la formación continua de los distintos tipos de células sanguíneas, de forma que se mantienen dentro de valores normales en la sangre periférica⁽¹¹⁹⁾. En el individuo adulto, la hematopoyesis se desarrolla en la médula ósea de los huesos esponjosos, debido a su gran superficie y su capacidad para permitir el anidamiento, crecimiento y diferenciación de las células germinales hematopoyéticas. Estas hallan en la médula ósea el lecho y el microambiente adecuados para su desarrollo y diferenciación hacia células maduras, capacidad que va disminuyendo con la edad. Dentro de los huesos que componen el esqueleto, aquellos con mayor función hematopoyética son las crestas iliacas, las vértebras y el extremo proximal del fémur⁽¹²⁸⁾.

3.2.1.2.- Regulación del metabolismo mineral.

Es conocido que el esqueleto es la fuente principal de calcio del organismo, conteniendo el 99% de las reservas del mismo. Desempeña un papel crucial en el equilibrio u homeostasis de la concentración sérica de calcio, pero también de otros iones como fósforo, sodio, hidrógeno y magnesio, necesarios para el correcto funcionamiento de una gran variedad de sistemas del organismo, así como reacciones enzimáticas, coagulación sanguínea y transmisión de los impulsos nerviosos⁽²⁴⁵⁾.

3.2.2.- Funciones mecánicas.

3.2.2.1.- Soporte y estabilidad mecánica.

Los huesos proporcionan un almacén rígido de soporte interno para toda la estructura corporal, sin el cual nuestro organismo se desmoronaría. Las funciones mecánicas del hueso han sido ampliamente estudiadas. La naturaleza mecánica del tejido óseo se extiende más allá de la clásica descripción de resistencia y rigidez propias del mismo, ya que incluye los mecanismos reparadores desarrollados para evitar la fractura por fatiga, es decir, fracturas producidas por una carga cíclica repetitiva sin superar los niveles fisiológicos de carga. Es interesante destacar el hecho de que la microestructura del hueso es un reflejo de los requerimientos mecánicos de cada organismo en particular y de la función a desempeñar por el hueso en cuestión, siguiendo un proceso de remodelamiento adaptativo definido por la denominada ley de Wolff: la orientación y dimensión de cada una de las trabéculas óseas depende fundamentalmente de las fuerzas aplicadas a cada hueso en particular^(31, 158).

3.2.2.2.- Protección para órganos vitales.

Los huesos del esqueleto proporcionan protección para los órganos más importantes: los huesos del cráneo protegen al cerebro; los de la columna vertebral protegen a la médula espinal; los del tórax, al corazón y a los pulmones, mientras que los de la pelvis, a los riñones y a los órganos sexuales. Esta protección se ve incrementada por la estructura anatómica de los huesos planos, compuesta por dos capas de hueso cortical con una capa de hueso trabecular intercalada, lo que permite una gran absorción de la energía transmitida por un traumatismo⁽¹⁷²⁾.

3.2.2.3.- Locomoción y movilidad del organismo.

Por último, los huesos sirven de palanca a los músculos esqueléticos que tienen su origen e inserción en ellos, permitiendo los movimientos del cuerpo por medio del aprovechamiento mecánico de la energía desarrollada por los músculos, de los que son base de apoyo.

Este movimiento se realiza a través de las articulaciones, que son las estructuras que se forman de la unión entre dos o más huesos, y que posibilitan su desplazamiento. Las articulaciones, estabilizadas por los ligamentos y movilizadas por la musculatura, como hemos comentado, pueden ser de dos tipos:

Articulaciones no sinoviales	No tienen revestimiento sinovial. No permiten grandes movimientos. Dentro de estas podemos diferenciar entre sinartrosis, que son fijas y no permiten movimiento; y anfiartrosis, que carecen de cavidad articular y membrana sinovial, y cuyos extremos se encuentran recubiertos de fibrocartílago (ejemplo: sínfisis púbica, disco intervertebral).
Articulaciones sinoviales o diartrosis	Se componen de cavidades articulares revestidas de sinovial y que contienen los extremos óseos, recubiertos de cartílago hialino. Poseen una cápsula articular fibrosa reforzada por ligamentos, y presentan líquido sinovial en su interior. Pueden presentar asimismo estructuras intraarticulares, como meniscos o ligamentos. Permiten un amplio rango de movimiento con una fricción muy baja.

Tabla 2: Tipos de articulaciones.

3.3.- ESTRUCTURA DEL TEJIDO ÓSEO.

Como órgano que es, el hueso está compuesto por diferentes tejidos (vasos sanguíneos y linfáticos, nervios, tejido adiposo y tejido conjuntivo), además del tejido óseo propiamente dicho, constituido a su vez por las células óseas y la matriz ósea. A diferencia de otros tejidos mesenquimales, el tejido óseo posee un componente inorgánico cristalino de gran importancia tanto cuantitativa como cualitativamente.

3.3.1.- Estructura macroscópica del hueso.

Los anatomistas distinguen 3 tipos principales de huesos atendiendo a la macroestructura de los mismos:

- Huesos largos. En estos la dimensión longitud prevalece sobre las otras dos (anchura y altura). Los huesos largos presentan una forma tubular, denominada diáfisis, que se ensancha en los extremos para formar las metáfisis, con forma de copa. La metáfisis se encuentra situada por debajo de la llamada placa epifisaria, cartílago de crecimiento o fisis, responsable del crecimiento óseo durante los primeros años de vida. Por último, en los extremos de estos huesos se encuentran las epífisis, regiones situadas por encima de la placa de crecimiento. El interior de la diáfisis es una cavidad hueca denominada cavidad medular. Son ejemplos de huesos largos el fémur, la tibia, el radio o el cúbito.

- Huesos cortos. Son aquellos que presentan una longitud similar en sus tres dimensiones espaciales. Son ejemplos de huesos cortos los huesos del carpo y del tarso, o las vértebras.
- Huesos planos. Aquellos en que dos de sus dimensiones pueden considerarse iguales, como los huesos del cráneo o la escápula.

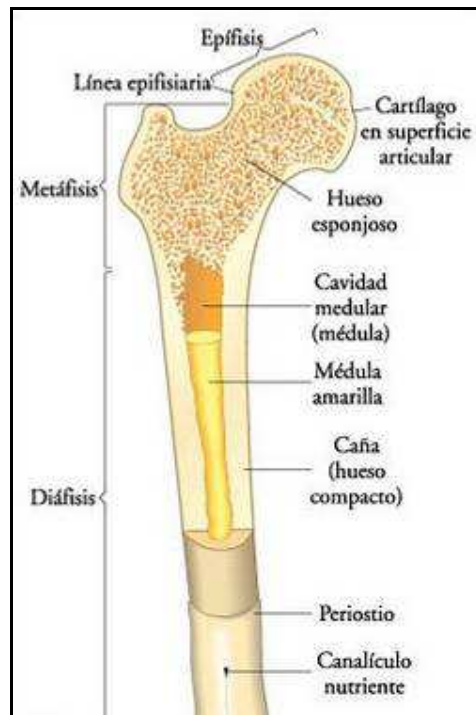


Figura 1: Esquema de la estructura macroscópica del hueso.
<http://es.slideshare.net/verorosso/sistema-oseo-2172218>

3.3.2.- Estructura microscópica del hueso.

Centrándonos en la disposición de los diferentes componentes constitutivos de la matriz ósea, se distinguen dos tipos de tejido óseo: el hueso fibrilar o primitivo, y el hueso laminar.

En condiciones normales, el **hueso fibrilar** se encuentra en el embrión, en el recién nacido y en la zona metafisaria del hueso durante el periodo de crecimiento. En los individuos adultos únicamente aparecerá hueso fibrilar en el calo de fractura y en algunos procesos tumorales. Destaca en su microestructura porque las fibras de colágeno presentan diámetros muy variables y no tienen una orientación uniforme. Además, en su matriz se localizan un gran número de células con tamaño y orientación

irregular. Esta estructura tan característica se debe a la rápida formación del mismo en respuesta a una necesidad del organismo⁽¹⁷²⁾.

Por su parte, el **hueso laminar** aparece sólo en huesos esqueléticamente maduros, y es prácticamente universal a partir de los cuatro años de vida. Se caracteriza en su microestructura por una orientación bien definida y paralela de sus fibras de colágeno, y por una presencia más dispersa y equilibrada de sus células, con un tamaño más constante.

Estas diferencias en cuanto a la microestructura se traducen en un comportamiento diferente ante las fuerzas mecánicas. Así, el hueso fibrilar, con una disposición irregular de sus fibras de colágeno, tiene un comportamiento isotrópico, respondiendo a las necesidades mecánicas del mismo modo con independencia de la dirección de la fuerza aplicada. Por su parte, el hueso laminar, con una disposición regular de sus fibras, presenta un comportamiento anisotrópico, oponiendo mayor resistencia mecánica cuando la fuerza aplicada es paralela al eje longitudinal de dichas fibras.

Propiedad	Hueso Trabecular	Hueso Cortical
Localización	Metáfisis y epífisis de huesos largos. En huesos cortos y planos e irregulares	Envoltorio de huesos cortos, planos e irregulares. Diáfisis de huesos largos
Armazón	Tridimensional, orientado según las fuerzas de carga. Mejor acceso de factores de regulación metabólica.	Denso, para ahorrar la mayor cantidad de material manteniendo la resistencia.
Área	Mayor	Mucho menor
Vascularización	Abundante	Menor
Densidad	Menor	Mucho mayor
Relación superficie/volumen	Alta	Baja
Disposición celular	En láminas y superficie	En osteonas
Remodelamiento	En superficie	En osteonas.
Recambio óseo	Alto	Bajo, ocho veces menor que el del hueso esponjoso
Resistencia	Menor. Sobre todo las fuerzas de compresión y cizallamiento	Alta. Sobre todo las fuerzas de tensión y torsión
Flexibilidad	Mayor	Menor

Tabla 3: Diferencias en organización y función de ambos tipos de hueso^(71, 172).

Tanto el hueso fibrilar como el laminar pueden agruparse y formar cada uno de los dos tipos de estructuras que conforman cada hueso: un tejido óseo compacto denominado **hueso cortical**, y un tejido óseo esponjoso o **hueso trabecular**. Mientras que el hueso compacto o cortical forma la superficie externa de todos los huesos, especialmente de la diáfisis de los huesos largos, el hueso esponjoso o trabecular se localiza en los extremos de los huesos largos (epífisis y metáfisis) y en el interior de los huesos planos y cortos⁽¹⁷²⁾. A su vez se encuentran recubiertos por dos tipos de membranas: una cubierta externa o **periostio**, y otra interna o **endostio**.

3.3.2.1.- Hueso cortical

El hueso compacto, denso o cortical constituye la cubierta externa rígida, que le da la apariencia lisa, blanca y sólida característica al tejido óseo, y en cuya superficie aparecen escasos espacios o soluciones de continuidad. Aproximadamente el 80% del total de la masa ósea del esqueleto adulto corresponde a hueso cortical.

Para rentabilizar y desarrollar sus funciones mecánicas, y poder ahorrar el mayor material posible a la vez que mantiene una adecuada resistencia, especialmente a las fuerzas de tensión y de torsión, presenta una arquitectura muy particular, constituida por el denominado sistema haversiano, cuya unidad básica es la osteona⁽¹⁵⁸⁾.

Una osteona consta de un canal central de Havers (en el que se alojan vasos y nervios) y varias capas de hueso laminar dispuestas concéntricamente alrededor de este canal. Las osteonas son estructuras cilíndricas de entre 150 y 200 μm de diámetro, y su eje es habitualmente paralelo al eje longitudinal del hueso. El límite periférico de estos cilindros lo marcan las llamadas líneas de cemento, caracterizadas por una menor concentración de colágeno, fósforo y calcio y una mayor concentración de sulfato cálcico (como en la sustancia osteoide). Como corresponde a todo hueso laminar, las fibras de colágeno de las osteonas se disponen en paralelo. Por su parte, los osteocitos integrantes de las osteonas se alojan en lagunas osteocitarias conectadas entre sí por canalículos a través de los cuales estas células extienden sus prolongaciones, formando así una verdadera red metabólica. El sistema haversiano se completa por las laminillas intersticiales, hueso laminar que ocupa los espacios existentes entre osteonas adyacentes, y las laminillas circunferenciales interna y externa. Los vasos que ocupan

los canales de Havers comunican con la superficie externa del hueso o con la cavidad medular a través de otros canalículos denominados de Volkmann^(202, 251).

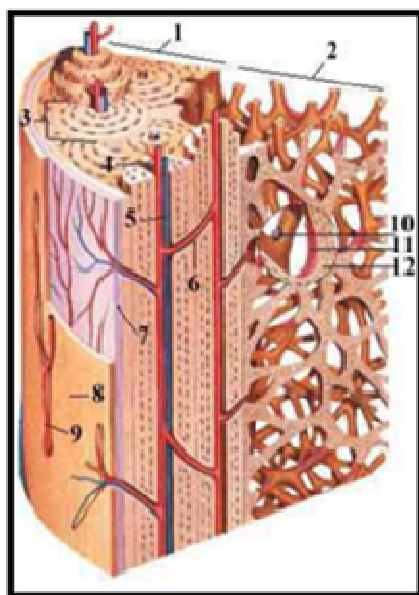


Figura 2: Esquema morfológico de la estructura ósea: hueso cortical y hueso trabecular. 1.- Hueso cortical. 2.- Hueso trabecular. 3.- Sistema de Havers. 4.- Vaso sanguíneo. 5.- Canal de Havers. 6.- Canal de Volkmann. 7.- Periostio. 8.- Revestimiento óseo. 9.- Vasos del periostio. 10.- Osteoclastos. 11.- Osteoblastos. 12.- Osteocitos. (Imagen tomada de <http://www.monografias.com/trabajos11/osteop/osteop.shtml>)

3.3.2.2.- Hueso trabecular.

El hueso trabecular o esponjoso es el componente que se encuentra en el interior de la estructura ósea, recubierto por el hueso cortical. Su organización básica la constituyen las trabéculas, conformando un armazón tridimensional cuya orientación sigue las fuerzas que predominantemente actúan sobre él, siguiendo la ley de Woff⁽³¹⁾. El hueso que se encuentra en el interior de cada trabécula es hueso laminar maduro; los osteocitos están orientados concéntricamente y tiene una red canalicular bien desarrollada.

Gracias a la porosidad característica de este tipo de tejido, que se encuentra relleno de médula ósea roja o amarilla y que representa el 75% del volumen óseo, se facilita el acceso de los agentes involucrados en la regulación de sus funciones metabólicas, transportados por los abundantes vasos que lo irrigan. De hecho, la actividad metabólica del hueso trabecular es casi ocho veces mayor que la del hueso

cortical, lo que puede ayudar a explicar porque diferentes enfermedades metabólicas tienen mayor efecto sobre el hueso esponjoso que sobre el cortical.

El hueso esponjoso está preparado para resistir fundamentalmente fuerzas de compresión y cizallamiento, y se encuentra principalmente en la metáfisis y epífisis de los huesos largos y en el interior de los huesos cortos, como las vértebras. Representa el 20% restante del total de la masa ósea⁽¹⁵⁸⁾.

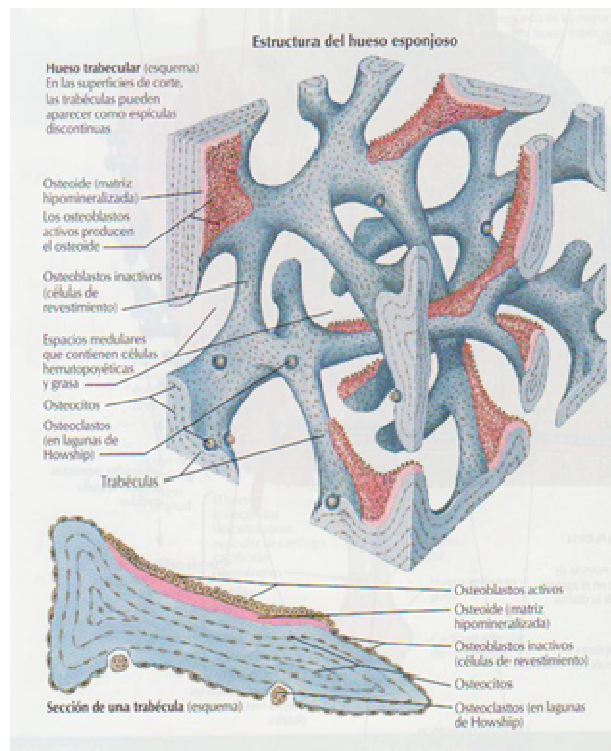


Figura 3: Esquema de hueso trabecular. Formación de matriz ósea hipomineralizada. En Thompson JC. In: Netter, editor. Atlas práctico de anatomía ortopédica. Barcelona: Masson; 2005. ⁽²⁴⁰⁾

En un hueso trabecular que esté creciendo o remodelándose de forma activa, la dirección de deposición ósea puede determinarse por la aparición de una fila de osteoblastos en un borde de la trabécula. La deposición de nuevo hueso por estos osteoblastos está compensada por la eliminación de hueso por los osteoclastos de la superficie opuesta de la trabécula. Por este procedimiento de resorción y deposición coordinadas, la posición de una trabécula puede cambiar dentro del hueso.

3.3.2.3.- *Periostio.*

El periostio es una capa densa de tejido conjuntivo fibroso que recubre todas las superficies óseas excepto las articulaciones, y que sirve de punto de inserción de músculos y tendones. En su interior se encuentran los vasos sanguíneos que nutren el hueso, así como las terminaciones nerviosas, osteoblastos y osteoclastos. La parte más

interna del periostio, denominada línea osteogénica, contiene las células óseas más activas, que permiten el crecimiento circunferencial del hueso⁽²⁴⁵⁾.

El periostio se encuentra anclado al hueso por sólidas fibras de colágeno denominadas fibras de Sharpey, que penetran en el interior del tejido óseo⁽⁶⁹⁾.

3.3.2.4.- Endostio.

El endostio es una vaina membranosa que también contiene vasos sanguíneos, osteoblastos y osteoclastos. Además de recubrir la cavidad medular, el endostio también cubre la superficie del hueso esponjoso y reviste los canales de los vasos sanguíneos (conductos de Volkman) que recorren el hueso⁽²⁰²⁾.

3.4.- COMPOSICIÓN DEL HUESO

El tejido óseo está compuesto por las células óseas y la matriz ósea. A su vez, la matriz ósea consta de un componente o matriz orgánica u osteoide (que constituye un 22-25% del peso del tejido), un componente o matriz inorgánica (que supone un 70% del peso) y agua (5-8% restante)⁽¹⁷²⁾.

3.4.1.- Células óseas.

En el tejido óseo se distinguen dos líneas celulares con una morfología y función diferenciadas: una línea formadora, cuya célula principal es el osteoblasto, y una línea destructora de hueso, siendo el osteoclasto su célula característica. Aunque constituyen menos del 2% del volumen total del hueso, protagonizan el desarrollo y remodelado del esqueleto a través de la actividad que llevan a cabo.

3.4.1.1.- Línea osteoformadora.

Esta línea la constituyen sucesivamente células progenitoras con un mayor grado de diferenciación: proosteoblastos, osteoblastos y osteocitos. Las células indiferenciadas con capacidad para transformarse en osteoformadoras se encuentran fundamentalmente en el endostio y en la capa celular del periostio (o cambium), situada inmediatamente por debajo de la capa fibrosa del mismo, donde se anclan ligamentos y tendones. Las células osteoprogenitoras son más activas durante la fase de crecimiento de los huesos, aunque también se reactivan durante la vida adulta en las situaciones en las que se inicia

la reparación de fracturas y otros daños óseos. Son las encargadas de realizar el proceso de osteogénesis, como veremos más adelante.

3.4.1.1.1.- Osteoblastos.

Los osteoblastos son las células osteoformadoras de los huesos maduros y en fase de desarrollo. Son células pequeñas de unas 20-30 μm , poliédricas y mononucleadas. Se localizan en la superficie ósea, revistiéndola por completo.



Figura 4: Imagen de osteoblastos. Tinción con HE.
http://celulasoseasshirley.blogspot.com.es/2009_10_01_archive.html

En cuanto a su estructura se caracterizan por la presencia de mitocondrias cargadas de calcio así como por un abundante retículo endoplásmico y aparato de Golgi, lo que revela que son células que sintetizan y secretan proteínas. Estas dos últimas estructuras adquieren un importante tamaño cuando los osteoblastos evolucionan hacia osteocitos⁽¹⁰⁹⁾. Los osteoblastos contienen fosfatasa alcalina, producen colágeno tipo I y otras proteínas no colágenas como la osteonectina, osteocalcina y osteopontina, además de diferentes factores de crecimiento que dan lugar a importantes efectos autocrinos y paracrinos sobre el crecimiento óseo. Poseen en su superficie receptores para PTH, 1,25-hidroxivitamina D, glucocorticoides, prostaglandinas y estrógenos, que influirán en su actividad.

La función principal de estas células es por tanto sintetizar el componente orgánico de la matriz ósea (fibras de colágeno), regular la mineralización de la misma, y controlar el flujo electrolítico entre el espacio extracelular y el hueso. Pero también juegan un importante papel en el proceso de destrucción ósea, al iniciar el proceso de

reabsorción mediante la secreción de proteasas neutras y otras sustancias que eliminarán la capa de osteoide no mineralizado superficial, necesario para que se inicie la actividad de los osteoclastos⁽²⁵¹⁾. Entre las patologías que aparecen ante la disfunción de estas células destaca la osteogénesis imperfecta.

La vida media de los osteoblastos humanos se sitúa entre 1 y 10 semanas, momento en el que se vuelven menos activos. Al final de su ciclo vital, los osteoblastos pueden desaparecer por un mecanismo de apoptosis o muerte celular programada, o bien transformarse en células de revestimiento o en osteocitos⁽¹⁶⁾.

3.4.1.1.2.- Osteocitos.

Originados a partir de los osteoblastos, los osteocitos presentan un volumen un 30% inferior que aquellos, debido a una disminución en su citoplasma. De esta forma, el núcleo se convierte en la característica fundamental de estas células, rodeado por abundante retículo endotelial y aparato de Golgi.

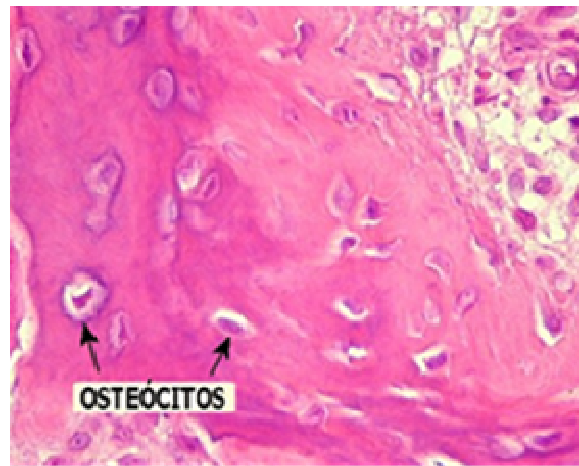


Figura 5: Imagen de osteocitos. Tinción con HE.
<http://www.acervoescolar.com.br/biologia/histologia/imagens/>

Los osteocitos son las células principales del hueso completamente formado, y residen en las lagunas situadas en el interior de la matriz ósea mineralizada. Su cuerpo celular se adapta a la forma lenticular de la cavidad que ocupa, pero emiten numerosas prolongaciones delgadas que se extienden por los canaliculos de la matriz, contactando con las células vecinas. De esta forma, las células óseas no están aisladas, sino en contacto unas con otras, alcanzando en último término las situadas más superficialmente, permitiendo el flujo de iones y otras moléculas pequeñas, y justificando la respuesta a los estímulos hormonales a los que aparentemente sólo tendrían acceso las células más superficiales. Su principal función consiste en contribuir al mantenimiento de la homeostasis mineral, ya que pueden captar el exceso de presión

o la aparición de grietas en el hueso y ayudar a dirigir a los osteoclastos a las localizaciones donde deben remodelar hueso⁽¹⁰⁹⁾.

3.4.1.1.3.- Células de revestimiento.

Los osteoblastos maduros pueden convertirse por último, al final de su ciclo vital, en las denominadas células de revestimiento o “*living cells*”. Sufren en esta transformación una elongación, volviéndose aplanadas y disponiéndose paralelas a la superficie ósea, disminuyendo su volumen y perdiendo su capacidad formadora de hueso⁽¹⁰⁹⁾. Se cree que cumplen una función importante en la regulación del intercambio de iones calcio y fósforo y en la respuesta hormonal del hueso, sintetizando diferentes proteínas que activan a los osteoclastos.

3.4.1.2.- Línea destructora de hueso

El hueso sufre durante toda la vida un proceso interno de remodelación y renovación a través del cual se elimina la matriz ósea en múltiples puntos y es sustituida por hueso neoformado. En este proceso, las células que llevan a cabo la reabsorción ósea son los osteoclastos, que pertenecen, como otras células del organismo involucradas en la lisis enzimática de tejidos, a la estirpe celular monocítico-macrofágica, con el proosteoclasto como escalón celular intermedio⁽¹⁷¹⁾.

3.4.1.2.1.- Osteoclastos.

Morfológicamente, son células de gran tamaño (10-100 μm de diámetro), con múltiples núcleos (entre 3 y 10), y abundancia tanto de vesículas como de mitocondrias, lo que pone de manifiesto su importante actividad enzimática. Poseen en su superficie receptores para calcitonina, que inhibe su actividad, también inhibida por los bifosfonatos. Se localizan en espacios de la superficie ósea trabecular denominadas lagunas de Howship, y en el frente de los conos perforantes corticales (cuya actividad se describe más adelante en el texto), entrando en contacto con la matriz ósea mineralizada mediante un borde rugoso cuya superficie aumenta el área de intercambio con el hueso⁽¹⁷²⁾. Contienen fosfatasa ácida resistente al tartrato.

Su función principal consiste en reabsorber hueso. Para ello se fijan a la superficie ósea mediante integrinas creando un espacio subosteoclástico aislado en el que desciende localmente el pH, con lo cual se disuelve el componente mineral de la matriz y se crea el entorno necesario para que las proteasas ácidas degraden el componente colágeno. La osteopetrosis o enfermedad marmórea de Albers-Schönberg es un defecto de la función osteoclástica.

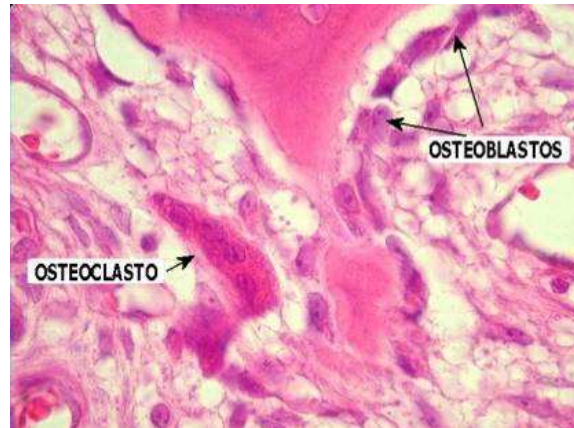


Figura 6: Imagen de osteoclastos y osteoblastos.
Tinción con HE. <http://tsaafd-rosaleda.blogspot.com.es/2010/10/huesitos.html>

Paradójicamente a lo que pudiera pensarse, los osteoclastos no tienen en su superficie receptores para las principales moléculas estimuladoras y activadoras de la reabsorción ósea, por lo que la activación de estas células por parte de la PTH, 1,25-dihidroxitamina D, ciertas prostaglandinas e interleuquinas y algunos factores tumorales se consigue mediante la activación previa de otras células como los osteoblastos. Cuando los osteoblastos se activan, expresan en la membrana la proteína RANKL (ligando del RANK), que se une al RANK (receptor activador del factor nuclear kappa) del proosteoclasto y hace que éste se active. Existe un receptor, la osteoprotegerina (OPG), que se une al RANKL inhibiendo así la diferenciación y activación del osteoclasto. En la actualidad se han desarrollado fármacos para el tratamiento de la osteoporosis cuyo mecanismo de acción es la inhibición de este mecanismo del RANKL, como el denosumab.

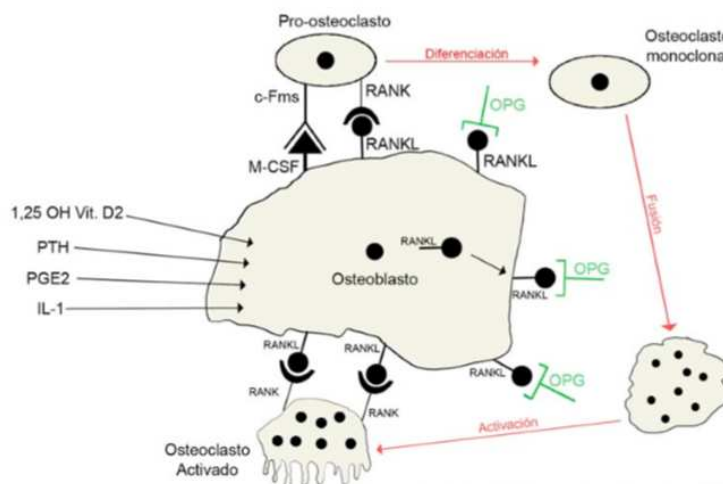


Figura 7: Activación del osteoclasto. C-FMS: receptor del factor estimulante de colonias de macrófagos; M-CSF: factor estimulante de colonias de macrófagos; RANK: receptor activador del factor nuclear kappa; RANKL: ligando del receptor activador del factor nuclear kappa; OPG: osteoprotegerina; 1,25-(OH)₂-vit.D₂: 1-25-dihidroxivitamina D₂; PTH: hormona paratiroidea; PGE₂: prostaglandina E₂; IL-1: interleucina 1.

<http://www.nature.com/bonekey/knowledgeenvironment/2009/0903/bonekey20090369/full/bonekey20090369.html>

3.4.1.3.- Células madre.

Las células madre, células progenitoras, o *Stem Cells*, nombre propuesto por el histólogo ruso Alexander Marksimov en 1908, son células indiferenciadas o no especializadas que tienen la extraordinaria capacidad de autorrenovarse y diferenciarse en diferentes tipos celulares bajo determinadas condiciones fisiológicas o experimentales⁽²⁵⁰⁾. Cada nueva célula resultante a partir de la división de una célula madre tiene el potencial de permanecer como otra célula madre, o bien diferenciarse a otro tipo celular si se dan las condiciones apropiadas⁽²²²⁾.

Los osteoblastos derivan de células progenitoras de origen mesenquimal (*MSC: Mesenchymal Stem Cells*) localizadas en la superficie del periostio y en el estroma de la médula ósea. Las células mesenquimales progenitoras presentan un amplio abanico de posibilidades para la diferenciación, transformándose en mioblastos, fibroblastos, adipocitos, condrocitos u osteoblastos en función de los factores de crecimiento o diferenciación que intervengan.

3.4.2.- Componente orgánico.

La matriz o componente orgánico del hueso, también llamada osteoide, corresponde a la tercera parte del peso óseo, y está formado por proteínas. A su vez, el 90% del peso seco de este componente lo constituyen fibras de colágeno, de las cuales

un 95% son colágeno tipo I, con disposición lineal. El 5% restante corresponde a colágeno tipo V y pequeñas cantidades de colágeno tipos III y XII⁽²⁵¹⁾. El componente colágeno del hueso es el principal responsable de la resistencia a las fuerzas de tensión.

El 5-10% del componente orgánico restante lo constituyen las denominadas proteínas no colagenosas (osteocalcina, osteopontina, osteonectina o proteína SPARC, proteínas procedentes del suero), proteoglicanos de bajo peso molecular, lípidos y moléculas que actúan como mensajeros intercelulares.

Colágeno	90%
Proteoglicanos	1,0%
Glicoproteínas	3,7%
Proteínas con ácido gamma carboxi-glutámico	1,7%
Albúmina y otras proteínas	0,3%

Tabla 4: Composición de la matriz orgánica.

Cuando el componente orgánico está sin mineralizar se denomina osteoide y se caracteriza por un mayor contenido de proteínas no colagenosas y agua que el de la matriz orgánica mineralizada⁽⁷²⁾.

3.4.2.1.- Colágeno

El colágeno es el componente estructural principal de los tejidos conectivos, incluyendo el tejido óseo. El hueso está compuesto fundamentalmente de colágeno tipo I. La especie molecular más común de colágeno tipo I es una molécula de triple hélice (estructura terciaria) compuesta por dos cadenas idénticas $\alpha 1$ y una cadena $\alpha 2$ (estructura secundaria), estructuralmente similares pero genéticamente diferentes⁽³⁷⁾. Estas moléculas presentan un ensamblaje intracelular a través de interacciones específicas entre los precursores de las cadenas (pro- α). Las cadenas pro- α de colágeno tipo I difieren de sus derivados metabólicos (cadenas α) por la presencia de secuencias adicionales en sus extremos N- y C-terminal⁽¹⁶⁴⁾. Estas cadenas α de colágeno se caracterizan por un codón repetido de Gly-X-Y (estructura primaria, donde X suele ser prolina, e Y es a menudo hidroxiprolina). Las triples hélices aparecen unidas formando la estructura cuaternaria o fibrillas.

Se han encontrado también cantidades muy pequeñas de colágeno tipo III, V y XII, si bien no está aclarado todavía si este colágeno pertenece a la propia matriz mineralizada o están en relación con los vasos sanguíneos asociados al hueso⁽⁸⁵⁾. Las fibras de colágeno proporcionan al hueso una eficaz resistencia a las fuerzas de tracción.

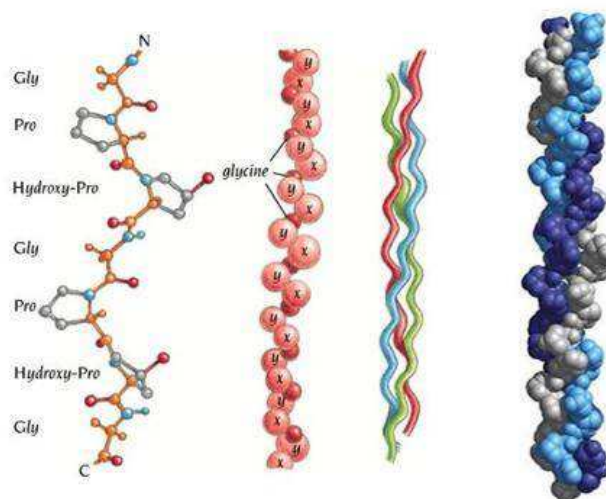


Figura 8: Estructura helicoidal del colágeno.

<http://bifi.es/~jsancho/estructuramacromoleculas/5Proteinasfibrosas/5protfibrosas.htm>

La molécula de colágeno contiene secuencias de aminoácidos que confieren al mismo la propiedad de adhesión celular (secuencia Arg-Gly-Asp o RGD), si bien *in vivo* es improbable que se realice tal actividad, ya que la superficie de las fibrillas colágenas no está expuesta. Del mismo modo no es probable que la molécula de colágeno sea un agente nucleador directo de la disposición de la hidroxiapatita, ya que no poseen la conformación tridimensional de la estructura ósea. Sin embargo muchas de las proteínas de la matriz que se asocian con el colágeno sí que proporcionan dicha conformación tridimensional; por tanto una de las funciones del colágeno puede ser orientar a esas proteínas de forma que expongan sitios activos que favorezcan las interacciones células-matriz o matriz-iones y se produzca el efecto nucleador para la precipitación de la hidroxiapatita. El colágeno tipo I es también un buen quimiotáctico de las células osteoprogenitoras. Sin el colágeno no se puede formar tejido óseo⁽⁸⁵⁾.

3.4.2.2.- Proteínas no colagenosas.

Las proteínas no colagenosas constituyen el 10-15% del contenido total de proteínas del hueso, y al igual que el colágeno son sintetizadas por los osteoblastos. A pesar de este pequeño porcentaje presentan importantes funciones metabólicas y estructurales. Aproximadamente una cuarta parte del contenido total de proteínas no

colagenosas es de formación exógena al propio hueso. Esta fracción está compuesta en gran medida por proteínas derivadas del suero, como la albúmina y la α 2-HG-glucoproteína, que tienen carácter ácido y se fijan a la matriz ósea por su afinidad con la hidroxiapatita.

Las proteínas no colagenosas las podemos dividir en:

- 1.- Proteoglicanos.
- 2.- Glicoproteínas.
- 3.- Proteínas con ácido gamma-carboxiglutámico.
- 4.- Factores de crecimiento.
- 5.- Proteínas plasmáticas.

Dentro del grupo de glicoproteínas o proteínas glicadas destacan la **fosfatasa alcalina** y la **osteonectina o SPARC**. Entre las proteínas γ -carboxiladas hay que destacar la **osteocalcina**.

Proteoglicanos	<ul style="list-style-type: none"> - Condroitinsulfato - Heparansulfato - Decorina - Biglucano - Hialuronano
Glicoproteínas	<ul style="list-style-type: none"> - Fosfatasa alcalina - Osteonectina (SPARC) - Otras glucoproteínas <ul style="list-style-type: none"> •Fibronectina •Trombospondina •Vitronectina •Osteopontina •Sialoproteínas óseas.
Proteínas con ácido γ -carboxiglutámico (GLA)	<ul style="list-style-type: none"> - Proteínas Gla de la matriz - Osteocalcina - Proteína S
Factores de crecimiento	<ul style="list-style-type: none"> - TGF-β - BMP - PDGF - IGF I y II
Proteínas plasmáticas	<ul style="list-style-type: none"> - Albúmina. - Alfa 2-HS glucoproteína

Tabla 5: Proteínas no colagenosas de la matriz

Una de las características diferenciadoras de la formación de hueso es la síntesis de altos niveles de **fosfatasa alcalina**. Esta enzima se considera como el distintivo de la

estirpe osteoformadora. Se encuentra principalmente fijada a la superficie celular aunque puede separarse de la misma y encontrarse dispersa en la matriz mineralizada. La función de la fosfatasa alcalina en la biología de las células óseas ha sido objeto de muchas especulaciones y todavía no está definida del todo, pero se trata de una proteína necesaria para la mineralización de la matriz osteoide⁽¹²⁾. Se cree que consigue esta mineralización a través de diferentes funciones⁽⁸⁵⁾:

- Liberando fosfato de otros constituyentes, incrementando de este modo la concentración local de dicho ion.
- Destruyendo inhibidores de la precipitación de la hidroxiapatita, como el pirofosfato.
- Actuando como proteína ligadora de calcio

La proteína no colágena más abundante de las producidas por las células óseas es la denominada **osteonectina, BM-40 o SPARC**. Se trata de una glicoproteína fosforilada responsable de aproximadamente el 2% de la proteína total del hueso en desarrollo en la mayoría de especies animales. Parece que posee múltiples funciones en el hueso y puede estar asociada con el crecimiento de los osteoblastos, con su proliferación o con ambos procesos, así como con la mineralización de la matriz. También se ha comprobado que regula la génesis de fibrillas de colágeno y el depósito de hidroxiapatita en estas fibrillas, y se une a factores de crecimiento ayudando al desarrollo del ciclo celular^(35, 285). Estas funciones se deben en gran medida a que esta proteína presenta una gran afinidad de unión con el colágeno tipo I, con el calcio y con la hidroxiapatita, debido a la presencia de dos puentes de unión con el calcio de alta afinidad y otras doce uniones de baja afinidad^(75, 125, 238). De esta manera la onectina actúa como mediador para permitir la unión del colágeno con la hidroxiapatita, ya que el colágeno no posee afinidad por el calcio. Se ha demostrado que los ratones transgénicos con carencia de onectina presentan un defecto en la formación ósea⁽⁵⁸⁾. Estudios inmunocitoquímicos han localizado esta proteína ósea en el interior del citoplasma de las células osteoprogenitoras endócticas, de los osteoblastos, de osteocitos recientemente profundizados y del hueso mineralizado⁽²²³⁾. Por su parte los estudios inmunohistoquímicos han localizado la proteína SPARC en los osteoblastos y en puntos de osificación entre los proteoglicanos y las fibrillas de colágeno, sugiriendo de esta manera que su principal función consistiría en proporcionar estabilidad a nivel de la

matriz extracelular. A partir de estos resultados se presupone que también ejerce un control sobre la orientación y el crecimiento de los cristales minerales en el osteoide⁽²³⁸⁾.

La **osteocalcina** es otra de las proteínas no colágenas más abundantes e importantes. Se encuentra ligada a la fase mineral y puede utilizarse como marcador bioquímico de la actividad osteoblástica, ya que son formadas por estas células. Entre sus funciones se encuentra la de regular la actividad de los osteoclastos y sus precursores, pudiendo marcar el punto de inflexión entre la formación y la resorción del hueso^(69, 90).

Algo más del 1% de las proteínas no colagenosas son los llamados “**factores de crecimiento**” que actúan como principales reguladores del metabolismo de las células óseas⁽¹⁶⁷⁾. Se desconoce realmente el número de factores de crecimiento que pueden afectar a la proliferación, a la diferenciación y a las funciones secretoras de las células óseas⁽¹⁴⁹⁾. Existen múltiples aplicaciones clínicas de estos factores en relación con la reparación ósea como son la aceleración del proceso de consolidación de las fracturas, la consecución de artrodesis vertebrales o el tratamiento de la pseudoartrosis⁽¹⁴⁸⁾. Por lo que se refiere a las proteínas morfogenéticas óseas o BMP (*bone morphogenetic protein*), su función actual en el proceso de formación ósea, así como en el de consolidación y curación de las fracturas, es bastante conocida⁽²⁰⁴⁾, y algunos estudios recientes han podido demostrar la eficacia de la BMP-2 humana tanto en la aceleración de la consolidación como en el descenso de la tasa de infección. Las BMP producen la diferenciación de las células osteoblásticas y potencian la función del osteoblasto⁽⁷²⁾.

En el espacio intercelular se observa por último abundancia de **proteoglicanos o mucopolisacáridos**. Estos se presentan en subunidades compuestas de moléculas de condroitínsulfato y queratínsulfato, unidas a una cadena central de ácido hialurónico⁽¹¹²⁾. Son responsables en parte de la resistencia a las fuerzas de compresión del hueso.

3.4.3.- Componente inorgánico y agua.

El componente inorgánico representa el 70% de la composición del hueso en seco y va formándose como consecuencia del proceso de mineralización que se establece sobre la matriz ósea. La sustancia inorgánica del hueso está formada de forma

prácticamente mayoritaria (en un 95%) por depósitos de un tipo de fosfato cálcico de tamaño nanométrico dispuesto en cristales análogos a los del mineral hidroxiapatita ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$). El mineral de hueso se deposita probablemente al principio en forma de fosfato cálcico amorfo y más tarde se reordena para formar hidroxiapatita cristalina. En su fase final, el fosfato cálcico está dispuesto en pequeños cristales con forma de delgados palillos de 1,5 a 3 nm de espesor y aproximadamente 40 nm de largo. Estos cristales se disponen ordenados en la misma dirección que las fibras colágenas. Los cristales de fosfato cálcico del hueso se localizan de forma preferente en los espacios que existen entre moléculas adyacentes de colágeno, formando con ellas una estructura bifásica cuyas propiedades son superiores a la suma de las propiedades de las dos fases por separado, confiriéndole al hueso sus excepcionales propiedades mecánicas. De esta forma, el tejido óseo es más resistente que el acero, si se tienen en cuenta sus respectivos pesos⁽⁷⁷⁾. A medida que el hueso es más maduro, es decir más laminar que reticular, el mineral o cristal de hidroxiapatita aumenta en cantidad, tamaño y perfección, y disminuye su contenido en carbonato y fosfatos ácidos. El componente inorgánico de la matriz ósea es el principal responsable de la resistencia del tejido óseo a las fuerzas de compresión⁽⁷⁰⁾.

Otras fases de fosfato cálcico que podemos encontrar en el hueso, y que representan el 5% restante del componente inorgánico, son fosfato cálcico básico no cristalino o fosfato cálcico amorfo, y las fases ácidas, fosfato octacálcico y brushita. No se ha demostrado que sean precursores en la formación de hidroxiapatita.

La importancia del agua para el funcionamiento mecánico del hueso no debe ser subestimada. Los valores de la mayoría de las características mecánicas del hueso en seco son diferentes de los del hueso hidratado. El agua se localiza entre las fibrillas de colágeno⁽⁴⁹⁾.

3.4.4.- Mineralización de la matriz osteoide.

El elemento clave para que se produzca la mineralización ósea es el osteoblasto. Las funciones de estas células con respecto a la mineralización son:

- Sintetizar el colágeno tipo I sobre el cual los cristales de mineral se depositan de una forma orientada.

- Regular la concentración adecuada de iones Ca, P y OH en la matriz para que se produzca la nucleación inicial de hidroxiapatita.

Contrariamente a lo que se creía en un principio el colágeno no es un agente nucleante directo de la mineralización ósea sino que esta función la desarrollan ciertas proteínas de la matriz que se encuentran en estrecha relación con el colágeno. De esta forma, el colágeno actúa como una estructura o “andamio” sobre el cual los cristales de mineral se alinean, siendo otros componentes de la matriz osteoide (fundamentalmente proteínas fosforiladas) las responsables de regular la deposición inicial y posterior crecimiento del mineral sobre las fibrillas de colágeno. Entre estas proteínas fosforiladas destacan la osteonectina, osteopontina y osteocalcina⁽⁸⁸⁾.

Por otra parte, existen moléculas inhibitoras de la mineralización ósea, como los proteoglicanos, el ATP y los iones pirofosfato (P_2O_7)⁻⁴.

Estudios *in vitro*, utilizando médula ósea como fuente de células osteoprogenitoras, han demostrado la secuencia de expresión de las proteínas producidas por el osteoblasto. Colágeno tipo I, histonas, fibronectina, osteopontina y otros componentes implicados en el desarrollo de la matriz, aparecen antes que la osteonectina o SPARC, fosfatasa alcalina y sialoproteína ósea, las cuales están más en relación con la mineralización de la misma. La osteocalcina aparece en etapas más tardías de la osteoformación⁽²⁸⁷⁾. Esta secuencia coincide con la teoría de que el colágeno proporciona un “andamio” sobre el cual se deposita el mineral, mediante la interacción de ciertas fosfoproteínas de la matriz con los iones Ca, P y OH⁻ en una concentración adecuada⁽⁶⁶⁾.

3.5.- PROCESO DE OSIFICACIÓN. OSTEOGÉNESIS.

Es importante saber diferenciar entre el proceso de calcificación y el de osificación. La calcificación consiste en el depósito de sales de calcio de muy bajo producto de solubilidad en la matriz osteoide como acabamos de ver, mientras que la osificación u osteogénesis es el proceso dinámico por el que se forma y deposita nuevo material óseo por parte de los osteoblastos⁽¹¹²⁾.

3.5.1.- Tipos de osificación

En el proceso de la osteogénesis existen dos vías distintas a través de las cuales el hueso realiza su osificación. Estas dos vías o tipos de osteogénesis se conocen con los nombres de osteogénesis intramembranosa y osteogénesis endocondral⁽²⁴⁹⁾. Las células mesenquimales que sufren osificación endocondral provienen del mesodermo paraxial y las que experimentan osificación intramembranosa derivan de la cresta neural. Ambos tipos de células mesenquimales tienen la capacidad de sufrir condrogénesis, pero interacciones con el tipo de epitelio que se encuentran durante su migración o al finalizar la misma, el nivel de calcio en el ambiente, y otras condiciones diversas determinan el tipo de osificación que se llevará a cabo⁽⁹⁹⁾.

La **osteogénesis intramembranosa** afecta a un grupo de huesos muy reducido y, en ella, una serie de células mesenquimales influenciadas por factores de crecimiento forman un núcleo de condensación en una zona vascularizada de tejido conjuntivo embrionario, diferenciándose en osteoblastos. Esta osificación se realiza mediante la producción y depósito directo de hueso sobre la estructura primitiva, sin la presencia de cartílago intermedio. El hueso resultante es reticular, y posteriormente se transformará en laminar. Los huesos de la bóveda craneal y la clavícula constituyen el ejemplo más típico de esta variante de osificación⁽¹⁹⁹⁾.

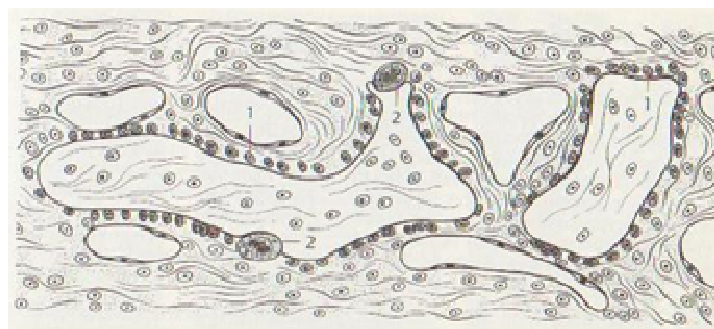


Figura 9: Osificación intramembranosa 1: Osteoblastos, que se forman a partir de las células mesenquimales. 2: Osteoclastos, que reabsorben hueso. En Platzner, Atlas de anatomía con correlación clínica. Tomo 1. Aparato locomotor. 9 ed. Madrid: Editorial Médica Panamericana.; 2010.⁽¹⁹⁹⁾

Por otra parte, la **osteogénesis endocondral** o encondral, que es la más frecuente, implica un precursor de cartílago que posteriormente se osificará⁽²⁷⁷⁾. El crecimiento solamente es posible si hay cartílago disponible. Sobre la estructura primitiva que se desarrolla durante el periodo embrionario, las células mesenquimales

van a diferenciarse en precondroblastos y condroblastos que segregan la matriz de cartílago. A partir de la séptima semana de la vida embrionaria, en el centro de la estructura cartilaginosa formada se establecerá un proceso de osificación de la matriz a través de un tejido conjuntivo vascular que va a aportar osteoblastos y a formar un hueso inmaduro que constituirá el “centro de osificación primaria”. Después del nacimiento, los extremos de los huesos largos son invadidos por vasos que proceden de los plexos periarticulares, comenzando en este lugar un proceso de osificación que da lugar a la formación de los “centros de osificación secundarios”⁽⁷²⁾. Es un requisito indispensable que haya condroblastos, que segregan la matriz del cartílago y con ello permiten que los osteoblastos formen el hueso⁽¹⁹⁹⁾.

El crecimiento longitudinal del esqueleto es resultado de la osificación encondral que ocurre en las placas de crecimiento de los extremos de los huesos largos. La función del cartílago de crecimiento está relacionada con su estructura, y comprende tres zonas diferentes: zona de reserva, zona proliferativa, y zona hipertrófica. A través de procesos secuenciales de proliferación celular, síntesis de matriz extracelular, hipertrofia celular, mineralización de la matriz, invasión vascular y apoptosis, el modelo cartilaginoso se va reemplazando por tejido óseo durante el crecimiento en longitud del esqueleto. La regulación de todo este proceso se realiza a través de la interacción entre hormonas y factores de crecimiento locales⁽¹⁶⁹⁾.

De esta forma, la formación de hueso mediante osificación endocondral es el resultado de dos procesos: la sustitución del cartílago embrionario por un lado, y por otro el crecimiento longitudinal de los huesos largos a expensas del cartílago de crecimiento durante la infancia⁽²⁴⁹⁾.

3.5.2.- Factores que influyen en el proceso de osificación.

El desarrollo y crecimiento del esqueleto se encuentra sometido a la influencia de diferentes factores de tipo genético, vascular, ambientales, y a la acción de distintas hormonas y factores de crecimiento.

La influencia de los factores genéticos en cuanto al volumen y densidad ósea queda demostrado por el hecho de que los individuos de raza negra posean una mayor

masa ósea que los de raza blanca, debido probablemente a que poseen unos niveles de hormona de crecimiento superiores⁽²⁷⁹⁾.

La relación entre osificación y angiogénesis es constante en ambos tipos de osteogénesis. Los osteoblastos producen factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) que estimula el crecimiento de los capilares en la matriz, y necesita la presencia de células vasculares para la maduración completa. La vascularización también es imprescindible para la curación de fracturas y el proceso de remodelado óseo que veremos posteriormente, debido a que los vasos sanguíneos aportan oxígeno, células sanguíneas, nutrientes, iones, vitaminas, hormonas y factores de crecimiento.

El efecto de los factores físicos y ambientales en la osificación queda demostrado desde el mismo momento de la embriogénesis. La actividad muscular del propio embrión y la transmisión al mismo de la actividad física de la madre, originan una serie de fuerzas que afectan a la forma del primordio cartilaginoso y por tanto, al esqueleto óseo. Estudios realizados sobre modelos animales han demostrado que el hueso de un miembro aislado de función durante ocho semanas experimenta una pérdida de un 10 a 15% de su volumen óseo, mientras que la aplicación de un régimen de cargas específico conduce al aumento del área de sección transversal ósea⁽²¹²⁾. El esqueleto está expuesto a un amplio rango de estímulos mecánicos (cargas compresivas y fuerzas tensionales); esta energía mecánica resultante se transformará en energía eléctrica usando el hueso como medio: son los denominados efectos piezoeléctricos. La electropositividad parece estimular la actividad osteoclástica mientras que la electronegatividad activa a los osteoblastos, favoreciendo la osteogénesis^(172, 212).

3.6.- REGENERACIÓN ÓSEA: MODELADO Y REMODELADO ÓSEO

El **modelado** es el proceso mediante el cual los huesos van adquiriendo su morfología y estructura normal y definitiva durante la edad de crecimiento, para seguir manteniéndose después durante la edad adulta. Se realiza a través de cambios sucesivos que se establecen sobre las superficies óseas, transformándose el hueso fibrilar en hueso laminar mediante la generación de osteonas primarias. De esta manera se establece un control continuo de la arquitectura y forma de los huesos. Es más activa en la zona

metafisaria y se prolonga en la madurez, observándose osteogénesis en el periostio y reabsorción en el endostio, lo que hace que aumente el diámetro óseo y adelgace la cortical^(71, 72). El modelado óseo se distingue del remodelado porque la formación del hueso no va estrictamente emparejada con una resorción ósea previa.

El proceso de **remodelado óseo** permite mantener al hueso en continuo dinamismo, y permite la renovación y sustitución del tejido óseo sin cambiar su arquitectura⁽²¹⁷⁾. Mediante el mismo, el hueso envejecido se va sustituyendo por hueso neoformado, proceso que se realiza por una acción coordinada entre osteoclastos y osteoblastos sobre las superficies del hueso esponjoso y cortical, modificando la estructura sin variar la forma del hueso. Este recambio mantiene la resistencia biomecánica, y así se evita el número excesivo de muertes osteocitarias que condicionarían una excesiva fragilidad ósea y, por lo tanto, la aparición de microfracturas⁽¹⁹²⁾. La actividad osteoblástica o formadora y osteoclástica o destructora se suceden de forma coordinada. Éste es un proceso que ocurre durante toda la vida aunque su ritmo decrece con la edad. Un 20% del total de la masa ósea se está remodelando en todo momento, tanto el hueso esponjoso como el cortical, de manera constante a lo largo de un ciclo de actividad celular⁽⁷²⁾.

Aunque este proceso presenta ciertas diferencias entre el hueso cortical y el trabecular, el remodelado óseo resulta de la secuencia de las tres fases siguientes^(72, 110):

- 1.- Activación de los osteoblastos y osteoclastos por estímulos físicos, hormonas y factores de crecimiento.
- 2.- Reabsorción por los osteoclastos de la matriz mineralizada.
- 3.- Formación de nuevo hueso por los osteoblastos que invaden el área reabsorbida.

En el hueso cortical, los osteoclastos una vez activados forman el denominado “cono de corte o de penetración”. Al mismo tiempo que se produce la fase de reabsorción tiene lugar la atracción y agrupamiento de osteoblastos en la base del cono. Estas células son las que van a sintetizar la matriz osteoide que va rellenando los conductos dejados por los conos de penetración, y que en una fase posterior será mineralizada.

En el hueso trabecular o esponjoso, la fase de reabsorción se produce en diferentes líneas alternas a lo largo de la interfase entre la médula y las laminillas óseas. De esta manera se producen ondulaciones sobre la superficie ósea denominadas “lagunas de Howship”⁽²¹⁷⁾.

Es importante tener conocimiento del significado de las expresiones “unidad ósea de remodelación” (BRU, *bone remodelling unit*) y de “unidad básica multicelular” (BMU, *bone multicellular unit*) en el proceso de remodelación. La BRU hace referencia al conjunto de fenómenos que participan simultáneamente en la resorción del hueso envejecido y en la formación del nuevo, siendo el resultado final la formación de la llamada “unidad estructural ósea” (BSU, *bone structural unit*). Frost denominó “unidad básica multicelular” a los conos celulares formados por osteoclastos y osteoblastos que intervienen en el remodelado del hueso cortical⁽²²⁾.

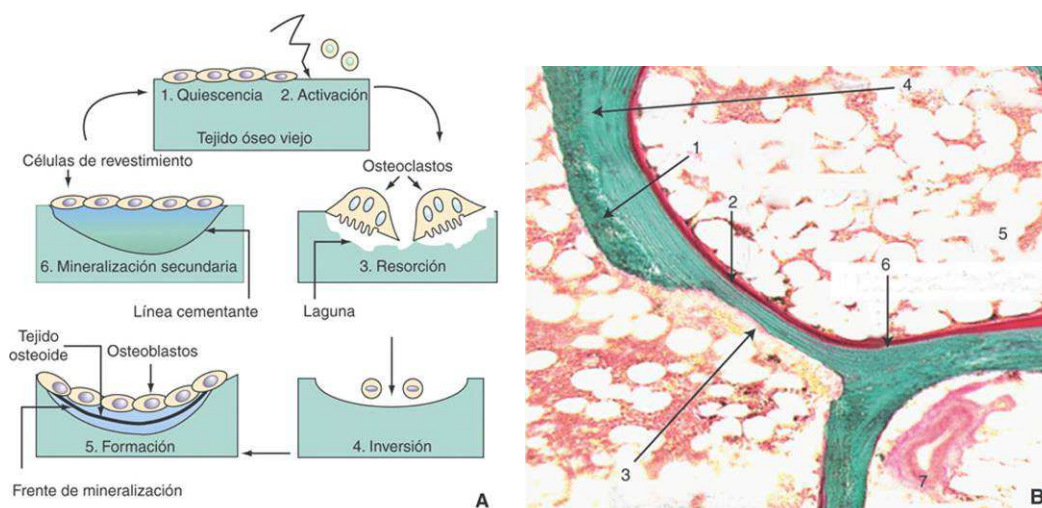


Figura 10: Remodelación ósea. A. Esquema de las fases de la remodelación ósea. B. Corte histológico del tejido óseo trabecular humano de la cresta ilíaca. Se observan dos BMU (basic multicellular units) en actividad. El corte de una de ellas muestra la fase de formación y el de la otra la fase de resorción (tinción tricrómica de Goldner, $\times 400$). 1. Tejido óseo calcificado; 2. tejido osteoide; 3. laguna de resorción; 4. línea cementante; 5. médula; 6. frente de mineralización; 7. vaso.⁽¹⁴¹⁾.

Para que el proceso de remodelado óseo se produzca de forma correcta, debe producirse un acoplamiento perfecto entre la reabsorción y formación óseas, de tal forma que la cantidad destruida sea sustituida por una cantidad similar de tejido óseo nuevo. Para ello debe producirse una comunicación entre las células responsables, que se atribuye a ciertos factores de crecimiento como los TGF- β y los IGFs⁽²⁰¹⁾.

El proceso de remodelado permite de esta manera la adaptación a los nuevos requerimientos de soporte, posibilita la reparación de zonas débiles o de microfracturas, contribuye a mejorar la distribución vascular del hueso y ayuda a mantener la homeostasis mineral. Se trata de un proceso adaptativo, de tal manera que el entramado trabecular se adapta a las alteraciones de la distribución de las fuerzas de carga que se repiten con una dirección y sentido predominantes; la orientación y dimensión de cada trabécula depende de las fuerzas aplicadas al esqueleto, según la ley de Wolff⁽³¹⁾.

3.6.1.- Biología de la regeneración ósea.

La remodelación ósea representa una verdadera regeneración, no sólo de células sino también de matriz extracelular. El hueso posee un potencial único para restaurar por completo su estructura original, aunque con ciertas limitaciones.

El crecimiento y desarrollo normal del esqueleto así como los procesos de remodelado y reparación óseos están regulados por una serie de factores sistémicos y locales que reflejan una acción cuidadosamente coordinada. Cada uno de los órganos o tejidos de un organismo multicelular, como en este caso el hueso, tiene un perfil de actividades metabólicas propias que le permiten realizar sus funciones especializadas. Las células deben coordinar su comportamiento con las células vecinas y con las de otros órganos del cuerpo, utilizando moléculas que les permitan la intercomunicación. El mecanismo más habitual es aquel en el que una célula (señalizadora) produce un tipo particular de molécula que es detectada por otra célula (diana) mediante una proteína receptora, que reconoce a la molécula señal y responde a ella mediante cambios metabólicos específicos⁽⁸⁾. A todo este proceso se le denomina transducción de señal, y las principales moléculas que actúan como mensajeros intercelulares son las hormonas, factores de crecimiento y citocinas⁽¹⁶²⁾.

Clásicamente se han considerado como principales responsables del crecimiento y remodelado óseo a la hormona del crecimiento o somatotropina (GH o *growing factor*) y a las hormonas calcitrópicas (PTH, 1,25(OH)₂-vit D₃ y calcitonina). Sin embargo, otras hormonas como las tiroideas, las hormonas sexuales y diversos factores de crecimiento también desempeñan una función importante en el metabolismo óseo. El efecto de las mismas sobre el tejido óseo queda reflejado en la siguiente tabla.

FACTORES HORMONALES	EFFECTOS SOBRE EL CRECIMIENTO ESQUELÉTICO	EFFECTOS ÓSEOS
Hormona de crecimiento (GH)	↑ CRECIMIENTO	↑ FORMACIÓN directamente y a través de IGF-I y II
Hormonas tiroideas	↑ CRECIMIENTO	↑ FORMACIÓN a través de GH e IGF-I. ↑ REABSORCIÓN
Hormona paratiroidea (PTH)	↑ CRECIMIENTO. Estimula la síntesis de proteoglicanos en los condrocitos de la placa de crecimiento.	↑ REABSORCIÓN ↑ FORMACIÓN en administración crónica a bajas dosis.
1,25(OH) ₂ -vit D3	—	↑ MINERALIZACIÓN ↑ REABSORCIÓN
Calcitonina	—	↓ REABSORCIÓN
Glucocorticoides	↓ CRECIMIENTO	↓ FORMACIÓN ↑ REABSORCIÓN
Estrógenos	↓ CRECIMIENTO	↑ FORMACIÓN
Andrógenos	↑ CRECIMIENTO	↑ FORMACIÓN
Retinoides	TERATÓGENO	NO
Insulina	↑ CRECIMIENTO	↑ FORMACIÓN.

Tabla 6: Factores hormonales y su efecto sobre el hueso⁽¹⁶²⁾.

Los factores de crecimiento son polipéptidos que actúan, al igual que las hormonas, como moléculas de señalización celular y difieren de éstas en que tienen un carácter más local, es decir, se producen y actúan en el mismo tejido^(172, 247). Los factores de crecimiento que hasta la fecha han mostrado una mayor influencia en el metabolismo óseo quedan reflejados en la siguiente tabla⁽⁴²⁾.

FACTORES DE CRECIMIENTO	EFFECTO
IGF-I y II (Factores de crecimiento análogos a la insulina)	↑ CRECIMIENTO esquelético. ↑ FORMACIÓN ósea. Acoplador de las fases reabsortiva y formativa de la remodelación ósea.
FGF (Factores de crecimiento fibroblástico)	↑ CRECIMIENTO esquelético. ↑ FORMACIÓN ósea.
TGF-α y β (Factores de crecimiento transformadores α y β)	↑ CRECIMIENTO esquelético. ↑ FORMACIÓN ósea. ↑ REABSORCIÓN ósea Acoplador de las fases reabsortiva y formativa de la remodelación ósea.
PDGF (Factor de crecimiento derivado de las plaquetas)	↑ FORMACIÓN ósea. ↑ REABSORCIÓN ósea
BMPs (Proteínas morfogenéticas óseas)	MORFOGÉNICAS ↑ FORMACIÓN ósea.
OGP (Péptido de crecimiento osteogénico)	↑ FORMACIÓN ósea.

Tabla 7: Efectos de los factores de crecimiento sobre el hueso.

3.7.- CONSOLIDACIÓN ÓSEA

Cuando un hueso es sometido a fuerzas que superan su resistencia mecánica aparece una fractura, iniciándose acto seguido el proceso de consolidación o reparación ósea. Se trata de una verdadera regeneración tisular y no de un proceso cicatricial, que tiene como objetivo restablecer la estructura anatómica y las propiedades mecánicas originales. La consolidación de las fracturas se origina tanto a partir del periostio como de la cortical, del endostio y de los tejidos adyacentes al foco de fractura.

2.7.1.- Tipos de consolidación ósea.

- **Consolidación directa, cortical o primaria:** cuando en el foco de fractura se consiguen unas condiciones de reducción anatómica y estabilidad máxima (placas de compresión o tornillos interfragmentarios a compresión). En estos casos se produce el paso de conos perforantes en las zonas de contacto y aposición osteoblástica de hueso nuevo en las zonas sin contacto. No participa tejido cartilaginoso ni aparece callo de fractura.

- **Consolidación indirecta o secundaria:** es la más frecuente y la que aparece en fracturas menos estables, no estabilizadas quirúrgicamente o con movilidad interfragmentaria. Consta de cinco fases sucesivas:

1. *Fase de hematoma:* se inicia nada más producirse la fractura. El hematoma es una fuente de moléculas de señalización que activan la cascada de procesos para la consolidación definitiva (quimiotaxis, angiogénesis y respuestas celulares variadas).



Figura 11: Fase de hematoma o inflamación.
Consolidación ósea
<http://traumaortopedia2013.blogspot.com.es/>

2. *Fase inflamatoria:* respondiendo a los mediadores liberados se producen los fenómenos característicos de toda inflamación: acúmulo de líquido intersticial por vasodilatación y aumento de la permeabilidad capilar, concentrándose localmente plaquetas, leucocitos polimorfonucleares y células de la serie mononuclear-fagocítica. La finalidad de esta respuesta inflamatoria es la limpieza del foco de fractura (osteolisis) para preparar el terreno de la consolidación. La presencia de un ambiente ácido impide una mineralización precoz.



Figura 11: Fase de hematoma o inflamación.
Consolidación ósea.
<http://traumaortopedia2013.blogspot.com.es/>

3. *Fase reparadora o de callo blando:* en esta fase se forma el callo de fractura, y está influenciada por la tensión de oxígeno del mismo. A mayor cantidad de oxígeno más diferenciación de osteoblastos; a menor cantidad de oxígeno más diferenciación de condroblastos. Éste proceso se inicia a partir del periostio y de las partes blandas por medio del reclutamiento de fibroblastos que se convierten en osteoblastos, tomando el aspecto de tejido cartilaginoso. En la zona central, con baja tensión de oxígeno, se produce un armazón cartilaginoso con colágeno de tipo II y condroblastos, apareciendo a continuación una osificación encondral.

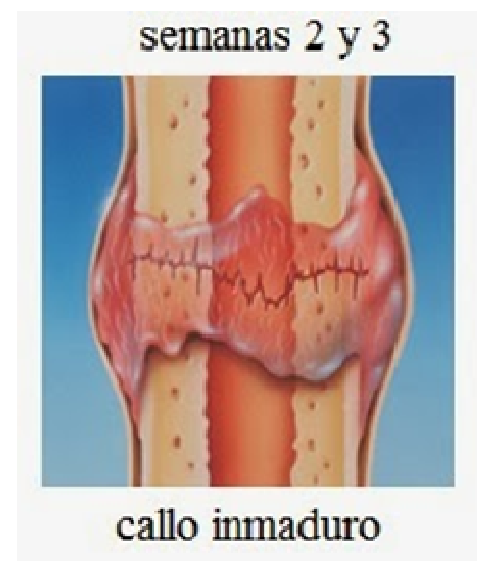


Figura 12: Fase reparadora o callo blando.
Consolidación ósea.
<http://traumaortopedia2013.blogspot.com.es/>

4. *Fase de osificación o callo duro:* en esta fase se produce la osificación del callo de fractura, y tiene lugar a partir de la segunda semana de producirse la misma. La célula dominante en esta fase es el condrocito, que libera vesículas de matriz que contienen proteasas, las cuales degradan la matriz, y fosfatasas que hacen precipitar el calcio de las mitocondrias de los condrocitos hipertróficos. Tras la calcificación del callo, éste se ve invadido por vasos sanguíneos, que aportan pericitos como células progenitoras de osteoblastos, iniciándose un proceso de recambio del hueso neoformado por hueso esponjoso.

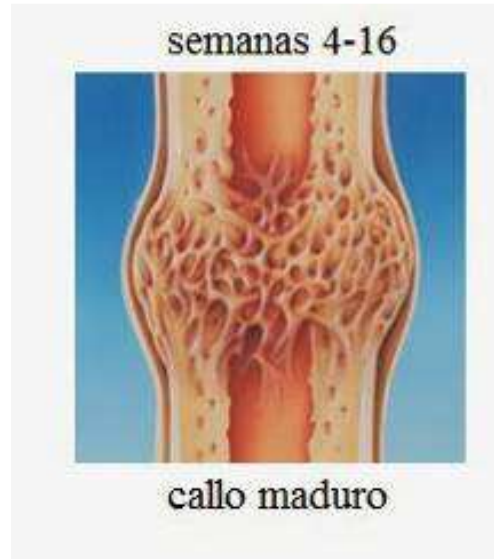


Figura 13: Fase de callo duro. Consolidación ósea.
<http://traumaortopedia2013.blogspot.com.es/>

5. *Fase de remodelación:* en un primer momento se crea hueso inmaduro o fibrilar isotrópico, es decir con las mismas propiedades mecánicas en cualquier dirección. Éste debe ser remodelado para orientar las trabéculas y la cortical según las cargas y convertirse así en hueso maduro, laminar y anisotrópico⁽¹⁸⁴⁾.

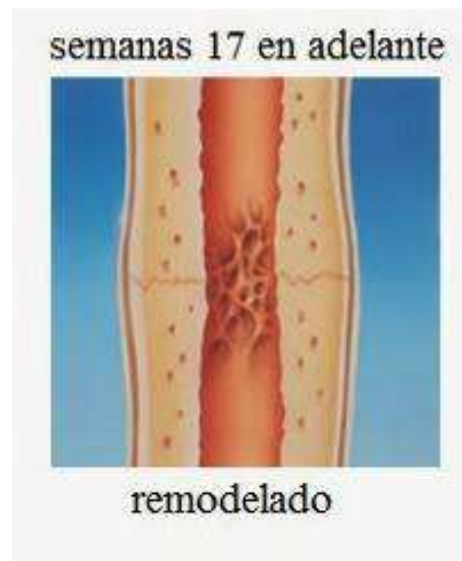


Figura 14: Fase de remodelado. Consolidación ósea.
<http://traumaortopedia2013.blogspot.com.es/>

3.7.2.- Factores que influyen en la consolidación de las fracturas.

Entre los factores locales y sistémicos que influyen en la consolidación de las fracturas hay que destacar los siguientes:

Factores favorables	Factores desfavorables
<ul style="list-style-type: none"> - Buen aporte vascular en el foco. - Gran área de superficie. - Estabilidad mecánica. - Carga mecánica. - Factores de crecimiento. 	<ul style="list-style-type: none"> - Irradiación. - Tumores. - Inestabilidad mecánica. - Infección. - Corticoides. - Quimioterapia. - Tabaquismo. - Diabetes. - Malnutrición proteica. - Enfermedad metabólica ósea. - Enfermedades infecciosas (VIH). - AINEs. - Quinolonas. - Bifosfonatos y calcitoninas

Tabla 8: Factores locales y sistémicos que influyen en la consolidación ósea⁽¹⁸⁴⁾.

4.- SUSTITUTOS ÓSEOS: INJERTOS Y BIOMATERIALES.

Se dominan sustitutos óseos a todos los tejidos o materiales que pueden emplearse para rellenar defectos del hueso, con el objetivo de promover la regeneración y reparación del tejido óseo. De acuerdo con esto podemos reconocer dos tipos fundamentales de sustitutivos, los **injertos óseos**, que corresponden a fragmentos de hueso natural implantables, y los **biomateriales o sustitutos óseos propiamente dichos**, diseñados y manufacturados para mimetizar algunas de las propiedades intrínsecas del hueso natural.

Para rellenar o subsanar el déficit de reserva ósea como en la cirugía protésica de revisión o en el tratamiento de infecciones o tumores, para favorecer la consolidación después de una fractura, o para el tratamiento de pseudoartrosis o ausencia de consolidación de fracturas, el cirujano ortopédico debe utilizar preferiblemente injertos óseos o en su defecto sustitutos óseos. Para la utilización con éxito de ambos en el aparato locomotor resulta crucial entender el ambiente biológico y biomecánico donde van a desempeñar su función. La incorporación de los mismos y la técnica quirúrgica adecuada resultan aspectos críticos en el buen resultado final.

4.1.- INJERTOS ÓSEOS.

La utilización de injertos óseos tiene una larga tradición dentro del campo de la cirugía ortopédica⁽⁹¹⁾. Estos procedimientos se sitúan entre las primeras intervenciones

quirúrgicas realizadas. En la actualidad, la necesidad de reponer masa ósea continúa siendo uno de los problemas más frecuentes a los que se enfrenta el cirujano ortopédico.

4.1.1.- Biología y biomecánica de los injertos óseos.

A la hora de implantar un injerto óseo es fundamental determinar el objetivo principal que debe cumplir el mismo:

- 1.- Función biológica: contribuyendo a la neoformación tisular por su aporte celular y proteico o actuando como armazón conductor de la angiogénesis y la proliferación celular.
- 2.- Función mecánica: actuando como estructuras de soporte para el relleno de cavidades o el refuerzo y solidarización de elementos disociados.
- 3.- Combinación de ambas funciones, como suele ser la norma⁽²⁵⁷⁾.

La funcionalidad biológica de un injerto es proporcionada por los factores de crecimiento osteoinductores; el injerto favorece la formación de tejido óseo de forma indirecta mediante la interacción con el ambiente biológico circundante del individuo receptor. Para ello es recomendable la utilización de partículas de hueso cortical con tamaños entre 300 y 800 μm , o bien partículas de hueso esponjoso con tamaños entre 1 y 3 mm.

La función mecánica es frecuentemente volumétrica, utilizándose el injerto como simple relleno de cavidades, de tal forma que cuando está bien contenido y adecuadamente compactado no está sometido a grandes sollicitaciones mecánicas. En estos casos el injerto ideal es esponjoso, aprovechando sus cualidades biológicas. Pero con una frecuencia creciente se hace preciso reforzar la estructura de amplios defectos óseos segmentarios con una inestabilidad potencial, en recambios de prótesis articulares y reconstrucciones oncológicas fundamentalmente, utilizándose en estos casos hueso cortical por su superior resistencia mecánica⁽²⁵⁷⁾.

En los casos en que se necesite de ambas propiedades, cuando se requiere una combinación entre osteogénesis y resistencia mecánica, puede utilizarse hueso cortico-esponjoso como el procedente de cresta ilíaca.

4.1.2.- Tipos de injertos óseos.

Dependiendo del origen se distinguen las siguientes variedades:

- 1.- Autoinjerto, procedentes del mismo individuo al que se implanta.
- 2.- Alonjertos o injertos alogénicos, procedentes de individuos diferentes de la misma especie.
- 3.- Isoinjertos: transferido desde un gemelo monocigótico a otro.
- 4.- Xenoinjertos: procedentes de individuos de distinta especie.

El **autoinjerto** continúa siendo el sustituto óseo ideal ya que posee las propiedades deseadas de osteogénesis (al aportar células osteoblásticas), osteoinducción (al contener factores de crecimiento) y osteoconducción (debido a su estructura porosa tridimensional) ⁽¹²⁰⁾. Estas propiedades dependen de las condiciones del lecho receptor, siendo imprescindible la presencia de células inducibles y de vascularización suficiente para que se produzca la neoangiogénesis, sin olvidar los factores mecánicos adecuados en cada momento de la incorporación: inmovilidad en las primeras fases y carga progresiva como estímulo de la remodelación en las fases más tardías.

El autoinjerto puede ser cortical, esponjoso o corticoesponjoso, y avascular o vascularizado. El autoinjerto cortical tiene la ventaja de ser capaz de aportar soporte estructural, mientras que el autoinjerto esponjoso proporciona menos soporte estructural pero más osteoconducción y, potencialmente, más osteogénesis y osteoinducción. Este mayor potencial biológico del hueso esponjoso se debe a su estructura trabecular, ya que las células yacen superpuestas en su superficie. Sigue considerándose en la actualidad como el “patrón oro”, pero su limitada disponibilidad y la morbilidad que asocia su extracción ha generado un interés creciente en la comercialización y desarrollo de otros sustitutos óseos especialmente de origen sintético. La zona donante de autoinjerto más frecuente es la cresta iliaca, asociándose en el 2-36% de los casos complicaciones, como formación de hematoma, hemorragia, lesión del nervio cutáneo femoral lateral o del nervio cluneal, formación de hernias musculares, infección, fractura, defectos estéticos y, a veces, dolor crónico en la zona donante⁽²⁹⁰⁾.

El **aloinjerto** procede de individuos diferentes de la misma especie. Extraído de cadáver es una fuente empleada con mucha frecuencia en la actualidad debido a la posibilidad de obtener grandes cantidades y en diferentes formas y tamaños. Presentan

un proceso de incorporación parecido al de los autoinjertos no vascularizados, aunque éste ocurre de forma más lenta y acompañado de un proceso inflamatorio atribuido a la respuesta inmunológica del receptor. El aloinjerto posee propiedades osteoinductoras y osteoconductoras, pero ha perdido su capacidad osteogénica en contraste con el autoinjerto debido a la ausencia de células viables^(65, 181). Entre sus limitaciones se incluye la respuesta inmunogénica por parte del receptor, que puede presentar una reacción a cuerpo extraño, y el riesgo potencial de transmisión de enfermedades (tasa calculada de posible transmisión de VIH de 1 por millón), así como la falta de uniformidad en la calidad del hueso trasplantado⁽¹⁹⁰⁾. Desde 1980 se han descrito dos casos de transmisión de VIH empleando aloinjerto musculoesquelético^(45, 242). Esto obliga a establecer severos controles en el funcionamiento de los bancos de huesos cuya organización supone el establecimiento de una serie de complejas infraestructuras que han de abarcar los procesos sucesivos desde la selección del donante hasta la conservación, procesamiento, distribución y utilización del aloinjerto⁽²⁵⁸⁾.

La calidad de las propiedades osteoconductoras, así como la resistencia mecánica del aloinjerto dependen en parte del método de procesamiento del mismo (fresco, congelado o liofilizado) y si es cortical o esponjoso. El aloinjerto fresco se utiliza poco, debido a la respuesta inmunitaria que puede generar, a la posible transmisión de enfermedades y a la extensa reabsorción y retardo de incorporación del mismo⁽²⁵⁷⁾. Este tipo de aloinjerto puede limpiarse y procesarse para eliminar las células y disminuir la reacción inmunitaria del huésped, lo cual, según se ha comprobado, favorece su incorporación. Por su parte el aloinjerto congelado o liofilizado disminuye la inmunogenicidad al mismo tiempo que conserva las propiedades osteoconductoras y potencialmente cierta capacidad osteoinductora⁽³⁸⁾. Mientras la congelación no afecta las características mecánicas del injerto, el liofilizado puede alterarlas, siendo este último el injerto más débil y vulnerable a la torsión y a la flexión⁽¹²⁹⁾. Aunque el remodelado y la revascularización de estos injertos es menor si los comparamos con los autoinjertos de esponjosa, los procesos de reabsorción, osteoconducción y osteoinducción ocurren de una forma más rápida. Los aloinjertos de esponjosa actúan como soportes a partir de los cuales las células del receptor formarán nuevo tejido óseo.

La falta de vascularización que se presenta con los aloinjertos corticales en comparación con el autoinjerto provoca una debilidad del mismo que se prolonga más

de un año después de la intervención. Este dato se ha atribuido a diferentes factores tanto mecánicos como estructurales que guardan relación con la densidad del hueso cortical siendo más rápida la incorporación de aloinjertos más pequeños como el procedente de peroné debido a su fácil vascularización⁽³⁰⁾.

Los aloinjertos osteocondrales masivos se utilizan en cirugía reconstructiva de alto grado, como en las resecciones tumorales o tratamiento de infecciones masivas. El injerto es procesado y sometido a tratamiento antibiótico. Su conservación se realiza a bajas temperaturas para disminuir aún más su carga antigénica. La incorporación de los mismos al receptor suele ser lenta⁽¹⁵⁷⁾. Debido a estas circunstancias la tasa de infecciones postoperatorias es más elevada que en otros tipos de cirugía pudiendo presentarse hasta en un 10-15% de casos. En un 10% de los casos no se logra la unión del injerto con la zona receptora. Existe un riesgo de fractura del 10%, sobre todo cuando se emplean injertos estructurales masivos, y hay que considerar la posibilidad de reabsorción del injerto entre el 4 y 14% de los casos⁽⁸⁰⁾.

AUTOINJERTO	Aspirado de médula ósea o células osteogénicas procesadas	
	Hueso esponjoso	
	Hueso cortical	No vascularizado
		Vascularizado
ALOINJERTO	Según procedencia	Cortical
		Esponjoso
		Osteocondral
	Según procesado	Fresco
		Congelado
		Liofilizado
		Desmineralizado

Tabla 9: Clasificación de los injertos óseos.

Dentro del aloinjerto, la **matriz ósea desmineralizada (MOD)** es probablemente la forma más común de aloinjerto empleada en nuestros días⁽⁶³⁾. Es un aloinjerto tratado mediante extracción con ácido suave para eliminar el contenido mineral del hueso pero conservando la estructura colágena y proteínas no colagenosas, entre las que se encuentran las proteínas morfogenéticas óseas. Tiene propiedades osteoconductoras, actuando como almacén para la formación de hueso de novo, pero no

proporcionan soporte estructural. Presentan una buena actividad osteoinductora⁽¹⁴⁷⁾, induciendo actividad osteocondrogénica de células pluripotenciales o de fibroblastos. Puede combinarse con otros sustitutos y se ha demostrado su eficacia como expansor de autoinjerto. Necesita de un transportador con rápida reabsorción, como glicerol, gelatina o ácido hialurónico, ya que si tarda en reabsorberse se retrasa su acción. Entre sus inconvenientes hay que destacar que se ha demostrado en diferentes estudios una variabilidad significativa entre productos y lotes en función del hueso donante y de las técnicas de preparación, especialmente en cuanto a la proporción de BMPs que presentan⁽¹⁸⁾.

La MOD se encuentra disponible en forma de pasta, gel o tiras moldeables. En cuanto a su aplicación clínica, en un estudio prospectivo del año 2004 en el que se incluyeron 120 pacientes sometidos a fusión espinal posterolateral instrumentada⁽⁴¹⁾, se pudo comparar la eficacia del autoinjerto de cresta en un lado de la artrodesis frente al autoinjerto mezclado con MOD en el otro lado. Se observaron tasas de fusión similares en ambos casos, concluyendo que en la MOD era un buen expansor del injerto de cresta en la artrodesis vertebral⁽²⁷³⁾. Para el resto de indicaciones (relleno de cavidades o defectos óseos, consolidación de artrodesis del retropié, etc.) se han publicado estudios con evidencia científica de nivel I⁽¹⁰⁵⁾.

Injerto	Osteogénesis	Osteoconducción	Osteoinducción	Propiedades mecánicas	Vascularización
AUTOINJERTO					
Matriz ósea	++	+/-	+	-	-
Esponjosa	++	++	+	+	-
Cortical	+	+	+/-	++	-
Vascularizado	++	++	+	++	++
ALOINJERTO					
Esponjosa	-	++	+	+	-
Cortical	-	+/-	+/-	++	-
Desmineralizado	-	++	+++	-	-

Tabla 10: Características biológicas y mecánicas de los injertos óseos (+++: actividad máxima; -: sin actividad)⁽¹²⁹⁾.

4.1.3.- Los procesos biológicos de incorporación del injerto.

Un injerto óseo cumple con su función cuando llega a unirse al lecho receptor de tal manera que su estructura y su fisiología comparten total o mayoritariamente las del tejido receptor, de tal forma que el conjunto puede soportar cargas mecánicas en rangos fisiológicos sin presentarse dolor ni fractura. A esta unión mecánica y funcional se le denomina **incorporación** del injerto. Para entender este fenómeno es necesario analizar los procesos básicos que tienen lugar en el lecho receptor, las interrelaciones que se producen con el tejido implantado y las modificaciones que tendrán lugar en uno y otro, dependiendo tanto de la estructura (esponjosa o compacta) como del origen del injerto (autólogo o alogénico).

Podemos describir varias fases biológicas en la interacción donante-receptor durante el proceso de incorporación del injerto, que son superponibles a las que ocurren en el proceso reparador de las fracturas. Se trata no obstante de un proceso continuo, en el que las diferentes fases se solapan unas con otras. Utilizaremos como ejemplo las fases del proceso de incorporación de autoinjerto esponjoso, entre las que se incluyen:

- formación del hematoma con liberación de citoquinas y factores de crecimiento,
- inflamación, migración y proliferación de células mesenquimales del receptor,
- desarrollo de tejido fibrovascular acompañado de numerosas células progenitoras, con la pequeña contribución de los osteoblastos supervivientes en el injerto (5%),
- invasión del injerto por vasos, a partir del segundo día, favorecido por la conductividad de los espacios intertrabeculares,
- reabsorción focal osteoclástica de la superficie del injerto,
- por último la formación ósea (endocondral o intramembranosa) en la superficie del mismo^(22, 129, 257).

Las células mesenquimales osteoprogenitoras inducibles del lecho receptor, activadas por los factores y citoquinas liberados, se transforman en osteoblastos que recubren los bordes de las trabecular necrosadas del injerto, depositando sobre ellas una capa osteoide que termina por envolverlas. Por otra parte, la presencia de vasos neoformados permite la llegada de precursores monocíticos de los osteoclastos. A partir de la tercera semana y hasta el tercer mes se van a combinar por un lado la aposición de hueso nuevo y por otro la reabsorción del hueso necrosado por los osteoclastos. Debido

al predominio inicial de formación ósea sobre la estructura preexistente se produce un aumento de densidad radiológica tanto en los injertos esponjosos como en los intentos reparativos de las necrosis isquémica de cabeza femoral. Por último, entre el tercer y el sexto mes, tiene lugar una lenta remodelación culminando en una redistribución eficiente de la microestructura interna según la ley de Wolff. En condiciones idóneas el proceso de remodelación se completa al año de la intervención⁽²⁵⁷⁾.

En la siguiente tabla se enumeran los factores locales y sistémicos que influyen en la incorporación del injerto

FACTORES	POSITIVOS	NEGATIVOS
Locales	<ul style="list-style-type: none"> • Buena vascularización. • Superficie amplia. • Estabilidad mecánica. • Carga. • Estimulación eléctrica. • Factores de crecimiento. 	<ul style="list-style-type: none"> • Radiación. • Malignización. • Infección. • Denervación. • Inestabilidad mecánica.
Sistémicos.	<ul style="list-style-type: none"> • Hormona de crecimiento. • Hormonas tiroideas. • Somatomedinas. • Vitaminas A y D. • Insulina. • Hormona paratiroidea. 	<ul style="list-style-type: none"> • Corticoides. • Antiinflamatorios no esteroideos. • Sepsis. • Quimioterapia. • Tabaco. • Diabetes. • Malnutrición.

Tabla 11: Factores locales y sistémicos que intervienen en la incorporación del injerto^(22, 129).

En el caso del autoinjerto cortical no vascularizado la invasión angiogénica del mismo se ve dificultada por su estructura compacta, debiéndose producir en primer lugar un proceso de reabsorción osteoclástica desde la superficie a la profundidad. Este proceso se denomina sustitución progresiva o “creeping substitution”, y tiene como consecuencia la fragilidad mecánica y una aparente disminución de la densidad radiológica⁽¹¹⁴⁾. Este proceso puede prolongarse durante meses o años, y si el injerto es de gran tamaño pueden incluso permanecer zonas del mismo necrosadas, alejadas de la invasión revitalizadora. Sin embargo cuando se emplea autoinjerto cortical vascularizado, como ocurre con los injertos libres de peroné, la fusión con el lecho receptor es rápida y la remodelación adaptativa es completa debido a la supervivencia de grandes cantidades de osteocitos.

En la incorporación de aloinjertos óseos coinciden los mismos procesos biológicos descritos, aunque existen diferencias cuantitativas. Debido a la ausencia de células viables estos injertos carecen de potencial osteogénico, su capacidad osteoinductora es menor, y la posibilidad de reacciones inmunológicas a partir de proteínas celulares limitan y retrasan la incorporación, remodelación y fusión con el receptor⁽²⁵⁷⁾.

Las propiedades biomecánicas de los injertos se mantienen inicialmente, pero son rápidamente modificadas por los procesos biológicos descritos. Si el acoplamiento entre la reabsorción del injerto y la osteogénesis es adecuado en cuanto a velocidad e intensidad, se producirá un remodelamiento adaptativo que conducirá a la estructura neoformada a responder a las necesidades mecánicas exigidas.

4.2.- BIOMATERIALES O SUSTITUTOS ÓSEOS.

Los sustitutos óseos son materiales sintéticos o naturales que se utilizan por sus características osteoconductoras. Su función básica consiste en proporcionar una matriz o andamiaje que se comporte como un soporte mecánico temporal, y una estructura porosa que será colonizada por los osteoblastos, con la consiguiente sustitución progresiva y formación de hueso. También pueden ser utilizados formando un biocompuesto con otros biomateriales, como los factores de crecimiento, con lo que dotaríamos a estos sustitutos de capacidad osteoinductora, que no poseen por definición⁽¹²⁰⁾. Otra función de los mismos es el transporte de sustancias, como antibióticos, con un efecto local en caso de infección, o su utilización en formulaciones inyectables que pueden ser empleadas en cirugía mínimamente invasiva para el relleno de cavidades óseas o para aumentar la fijación del material de osteosíntesis en pacientes con hueso osteoporótico. La disciplina que se encarga del estudio y aplicación de estos sustitutos óseos es la ingeniería tisular.

En las últimas décadas se está produciendo un gran auge en el desarrollo y comercialización de diferentes sustitutos óseos, tanto artificiales sintéticos como biológicos desnaturalizados, que puedan sustituir al injerto en el relleno de cavidades óseas.

Las características que debería presentar un sustituto óseo ideal para comportarse como un buen osteoconductor del remodelado óseo son las siguientes^(120, 130).

Bioactividad o biointegración	Capacidad de formar un enlace con el hueso huésped, sin interposición de una cápsula fibrosa intermedia. Todos los materiales bioactivos presentan en su superficie una capa de apatita similar al mineral óseo. Las células pueden proliferar sobre esta capa para diferenciarse y producir matriz extracelular, que es capaz de establecer enlaces químicos estables con la superficie del material implantado.
Biocompatibilidad	Capacidad de no provocar reacciones alérgicas o inmunológicas de rechazo en el huésped.
Biodegradable o reabsorbible	El sustituto óseo ideal debería ser biodegradable, pero de manera controlada para permitir la transferencia de cargas al hueso en formación. Los sustitutos que son rápidamente degradados o los que no son biodegradables comprometen la función mecánica y biológica del hueso.
Propiedades mecánicas	El tejido óseo responde a las fuerzas físicas en carga a las que se ve sometido. En respuesta a estas cargas físicas se forma o se reabsorbe hueso. Teniendo en cuenta este principio es importante que el diseño del biomaterial o matriz posea propiedades mecánicas similares a las del hueso circundante.
Porosidad	Los poros deben ser de un diámetro adecuado para permitir la penetración de células y vasos sanguíneos en la matriz, y deben estar interconectados para permitir el intercambio de nutrientes desde la periferia hacia el centro. El tamaño óptimo del poro se sitúa entre 150 y 500 μm según diferentes estudios. Para las matrices basadas en fosfato tricálcico se ha propuesto una porosidad cercana al 50% para mantener el equilibrio entre resistencia mecánica y permeabilidad ⁽⁷⁸⁾ .

Tabla 12: Características del sustituto óseo ideal.

4.2.1.- Biomateriales inorgánicos.

4.2.1.1.- Aleaciones metálicas (biomateriales inorgánicos metálicos).

El número de elementos metálicos que se utilizan para la fabricación de implantes es muy limitado, en torno a una docena del total de elementos del sistema periódico. El primer requisito es su tolerancia por parte del organismo, por lo que es muy importante la dosis que se pueda aportar a los tejidos vivos. También es imprescindible que presenten una buena resistencia a la corrosión, ya que el organismo se comporta como un medio hostil, con temperaturas del orden de 37°C.

A continuación se esquematizan las principales aleaciones metálicas empleadas en la actualidad:

Material	Composición	Usos	Ventajas	Inconvenientes
Acero.	60% de hierro, 20% de cromo, 15 % de níquel y 3% de molibdeno, trazas de otros elementos (Aleación 316L).	Fabricación de material de osteosíntesis (placas, tornillos, clavos, fijadores externos.	Bajo precio, maleabilidad y ductilidad.	Lenta corrosión por lo que conviene utilizarlos únicamente como implantes temporales. No pueden fabricarse superficies porosas por corrosión. Mayor riesgo de infección que otras aleaciones ⁽⁴⁸⁾ .
Aleaciones de cromo y cobalto (CrCo).	60% de cobalto, 30% de cromo y 7% de molibdeno, trazas de otros elementos como wolframio o níquel.	Fabricación de vástagos para cementar, cabezas de prótesis totales de cadera y cóndilos femorales de prótesis totales de rodilla.	Máxima resistencia a la fractura, a la fatiga y al desgaste, siendo tras las aleaciones de titanio las más resistentes a la corrosión.	Excesiva rigidez que facilita la aparición de osteoporosis por transmisión de cargas a distancia, alto coste, posible liberación de partículas de cromo, cobalto y níquel ^(48, 257) , que presentan un comportamiento tóxico para el organismo.
Aleaciones de titanio.	<ul style="list-style-type: none"> - Aleaciones de titanio, aluminio y vanadio en EEUU. - En Europa este último se sustituye por hierro o niobio ya que se ha demostrado que el vanadio es citotóxico⁽⁵⁰⁾. 	<ul style="list-style-type: none"> - Materiales de osteosíntesis: titanio comercialmente puro, que es fácilmente mecanizable y soldable. - Componentes de artroplastias: las combinaciones comentadas. 	<ul style="list-style-type: none"> -Biocompatibilidad superior que el resto de aleaciones metálicas, que se traduce en una alta resistencia a la corrosión y en la capacidad de aceptar la aposición interna sobre sus superficies de tejido óseo sin interposición de membrana fibrosa (osteointegración) - Menor rigidez que otras aleaciones, disminuye el efecto de osteoporosis por transmisión distal de cargas (<i>stress-shielding</i>). -Material bioinerte al no generar respuesta inmune en el huésped. -Presenta menor citotoxicidad que el níquel y el cobalto, y tiene un menor riesgo de infección. 	<ul style="list-style-type: none"> -Escasa resistencia a la fricción y aparición de un desgaste acelerado, lo que impide su utilización en superficies de fricción de artroplastias. -Las partículas de titanio producidas del desgaste de implantes, suprimen la diferenciación de los osteoblastos e inhiben la mineralización de la matriz extracelular.
Tantalio	-Metal de transición muy duro y que presenta una gran resistencia	-Superficies porosas del componente acetabular de prótesis totales de cadera o el	-Permite la fabricación de estructuras porosas intercomunicadas, en las que se desarrolla un crecimiento óseo muy rápido.	-Alto precio -Escasa resistencia a la fricción y aparición de un desgaste acelerado, lo que impide su utilización en

	mecánica.	componente tibial en prótesis de rodilla. -Reconstrucción de defectos óseos. -Artrodesis espinal intersomática.		superficies de fricción de artroplastias.
Aleaciones metálicas en recubrimientos porosos.	-Diferentes procedimientos metalúrgicos: sinterización de varias capas de bolitas, adhesión por difusión de capas de malla de alambre y el chorro de plasma de polvo metálico.	- En los implantes protésicos de CrCo y de Ti se han introducido superficies porosas.	-Facilita la penetración de tejido óseo en sus anfractuosidades por un proceso de osteogénesis similar al de la reparación de fracturas, fijando de manera “biológica” el implante y prescindiendo del empleo de cemento. -Las condiciones ideales deben incluir una fijación estable del componente, un lecho óseo receptor con vascularización adecuada y un tamaño adecuado del poro (150-400 micras) ⁽¹⁷²⁾ .	-No se ha demostrado su superioridad a largo plazo frente a otras fijaciones cementadas y no cementadas.

Tabla 13: Aleaciones metálicas utilizadas en la actualidad.

4.2.1.2.- *Materiales cerámicas (biomateriales inorgánicos no metálicos)*

Se trata de un amplio grupo de materiales que contienen elementos metálicos y no metálicos con uniones iónicas en un estado altamente oxidado. Dentro de las cerámicas utilizadas como biomateriales se incluyen los óxidos de cerámica como Al_2O_3 , MgO , SiO_2 y ZrO_2 , que presentan una alta biocompatibilidad y que se han utilizado como superficies de fricción en artroplastias, y también como aumentos o sustitutos óseos.

Las cerámicas utilizadas como superficie de fricción presentan una gran resistencia a la compresión y menor a la tracción, son quebradizos (fallan sin presentar previamente deformación plástica), rígidos, presentan gran resistencia al desgaste y una excelente biocompatibilidad debido a su gran hidrofilia y humedad, que facilitan su lubricación.

La utilización de cerámicas reabsorbibles sintéticas como sustitutos óseos fue introducida en 1969. El nombre de cerámica reabsorbible se refiere al proceso de degradación que ocurre tras la implantación en el receptor, de tal manera que son progresivamente reemplazados por tejidos endógenos. Ejemplos de cerámicas reabsorbibles son el fosfato cálcico, la hidroxiapatita y el fosfato tricálcico⁽²⁴⁾.

- **Alúmina (Al_2O_3):** las que se utilizan en la actualidad se consideran de tercera generación y se obtienen por sinterización (isostática a alta presión y temperatura) de polvo cristalino, consiguiendo unas cerámicas de alta pureza y grano muy pequeño, lo cual disminuye su fragilidad. Exige gran precisión de fabricación. Su gran dureza disminuye el desgaste por tercer cuerpo cuando se utiliza como superficie de fricción. Entre las ventajas hay que destacar que presenta mejores coeficientes de fricción consigo misma (par alúmina-alúmina) y con el polietileno, no empeorando dichos coeficientes con el paso del tiempo, así como mínima producción de partículas de desgaste. Entre sus inconvenientes hay que destacar su fragilidad y alto coste de fabricación^(48, 100).

- **Circonia:** presenta una mayor resistencia que la alúmina pero peor par de fricción con el polietileno. Actualmente está en desuso por su alto desgaste a medio y largo plazo. Se cree que es debido a microalteraciones de su superficie que conllevan ulceraciones y presencia de un tercer cuerpo. Los pares de fricción de circonia-alúmina y circonia-circonia presentan un desgaste catastrófico.

En la actualidad se está utilizando la combinación de alumina y circonia en un mismo material⁽¹⁷⁷⁾, denominado comercialmente cerámica Delta. Está compuesto en un 81% por alúmina y en un 19% de circonia, y presenta un característico color rosa. Se está utilizando esta combinación para cabezas femorales con buenos resultados a medio y largo plazo, incluso en pacientes jóvenes, ya que al preesentarse mayor dureza son menos vulnerables al daño preoperatorio y producen menos cuerpos libres. Son las llamadas cerámicas de cuarta generación.

- **Sulfato de calcio:** se trata del material utilizado normalmente para confeccionar los vendajes de escayola. Su utilización como sustituto óseo data de 1892, cuando se utilizó para rellenar defectos cavitarios en el hueso. Yeso de pureza

quirúrgica, que se comercializa en forma de bloques, gránulos o con formulaciones inyectables. Entre sus ventajas destacan su biocompatibilidad, facilidad de empleo para relleno de defectos y su bajo precio. Entre sus inconvenientes hay que destacar su escasa resistencia mecánica, que no forma una estructura trabecular, y su rápido índice de reabsorción mediante disolución química (entre 4 y 12 semanas), de tal forma que si no se forma hueso tan rápidamente como se reabsorbe fracasará su utilización como sustituto óseo⁽²²⁾. Se cree que durante su disolución produce una solución ácida que desmineraliza el hueso circundante, exponiendo de esta forma las proteínas morfogenéticas de la matriz. Es por este motivo por lo que se piensa que actúa como osteoinductor y no como osteoconductor⁽⁹⁸⁾.

- **Fosfatos de calcio:** bajo este término se engloba una amplia familia de elementos cerámicos que contienen iones calcio (Ca^{+2}) junto con iones de ortofosfato (PO_4^{-3}), metafosfato o pirofosfato ($\text{P}_2\text{O}_7^{-4}$), y con iones de hidrógeno (H^+) o hidroxilo (OH^-). Se utilizan para el relleno de distintos defectos óseos, superficies de recubrimiento, matrices óseas, como vehículos de fármacos y para la formación de artrodesis en el raquis. Se han utilizado en el campo de la medicina y de la cirugía oral desde la década de los 80. Presentan una alta resistencia a las fuerzas de compresión, pero son muy frágiles a la flexión, a la torsión y al cizallamiento. Se comercializan en gránulos, bloques o polvo⁽⁹⁵⁾, y pueden administrarse como cementos. Son bioactivas, presentando un alto grado de osteoconducción, pero sin capacidad osteoinductiva. Sufren degradación por parte del huésped por fenómenos físicos (abrasión y fractura), químicos (disolución) y biológicos (fagocitosis)⁽¹⁷⁷⁾. Esta solubilidad depende de múltiples factores como la forma, porosidad, composición, estructura cristalina, tipo de superficie y pH del medio. Tras su implantación, los poros de pequeño tamaño son invadidos por fluidos y aumenta la concentración de Ca y P, lo cual desencadena una precipitación de nuevos cristales de apatita similares a los del hueso. Por su parte los poros de mayor tamaño facilitan el crecimiento de mamelones vasculares acompañados de células osteogénicas (osteoconducción)^(48, 142). Pueden dividirse en dos grandes grupos: **apatitas** (hidroxiapatita (HA), cloroapatita o fluoroapatita) y **fosfatos cálcicos no apatitas** (como el fosfato cálcico dihidratado, fosfato tricálcico)⁽¹⁴⁰⁾.

La principal ventaja de la utilización de los cementos de fosfato cálcico es que pueden ser inyectados y que fraguan *in situ*, lo que clínicamente los convierte en un

material de fácil manipulación que puede ser utilizado incluso de forma percutánea. La principal desventaja es la extrusión del cemento a las articulaciones o tejidos blandos circundantes. Se ha demostrado su utilidad clínica en series de fracturas de radio distal tratadas con agujas, fracturas de cadera para aumentar la presa del tornillo cefálico deslizante en huesos osteoporóticos, y en fracturas de meseta tibial con hundimiento articular para proporcionar apoyo subcondral complementario⁽⁹⁸⁾.

- **Hidroxiapatita (HA):** se trata de un mineral natural que presenta una forma cristalina hexagonal y que está compuesto por fosfato cálcico con la fórmula $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$. Dentro de los fosfatos clásicos, la HA presenta la solubilidad más baja en agua a un pH fisiológico. Este hecho explica porqué los iones calcio en el organismo se encuentran en un estado sólido y depositados en los tejidos óseos. Sin embargo, la HA es soluble en soluciones ácidas como las que se presentan en los casos de infecciones o en los bordes de los osteoclastos en condiciones biológicas⁽¹⁴⁰⁾. La HA sintética se utiliza normalmente como relleno óseo o como recubrimiento en implantes protésicos para facilitar la osteointegración, ya que se trata del principal componente inorgánico del hueso humano como hemos visto y presenta una alta bioactividad y biocompatibilidad⁽²⁾. Es un buen osteoconductor, y presenta un tiempo de degradación mayor que otros biomateriales, y no presenta reacción inmunológica tras su implantación. La HA sintética debe asemejarse todo lo posible al componente natural óseo tanto cristalográficamente como químicamente. La proporción de los diferentes fosfatos cálcicos entre Ca y P es variable, demostrándose que la HA con un ratio Ca/P de 1,67 es el que presenta una mayor estabilidad termodinámica en un ambiente natural ($\text{pH} > 5,4$) y por ello es la proporción más utilizada en la síntesis de sustitutos⁽⁷⁹⁾. Se trata de una cerámica bioactiva que presenta una buena respuesta interferencial, facilitando la adhesión ósea por lo que es frecuentemente utilizada como recubrimiento protésico, estimulando de esta forma el crecimiento óseo y aumentando la adherencia de las artroplastias^(25, 46). De hecho se ha demostrado que las fuerzas de cizallamiento en implantes de titanio recubiertos de HA aumenta hasta ocho veces, y que el crecimiento óseo es considerablemente mayor en comparación con implantes sin este recubrimiento, aumentando el depósito óseo al menos durante el primer mes postimplantación⁽⁴⁶⁾. Pero estos datos parecen no presentar una correlación clínica en resultados a medio y largo plazo, y de hecho en implantes de cadera no se han demostrado mejores resultados cuando se utilizan vástagos con recubrimiento de HA^(40, 84, 227).

En la tabla 14 se presenta una comparación de las propiedades mecánicas del tejido óseo humano y de las biocerámicas más utilizadas. La HA sintética presenta una resistencia a la flexión comparable a la del hueso humano. Sin embargo el módulo de elasticidad y la resistencia a la compresión de la HA sintética son mayores que los del hueso humano, mientras que la resistencia a la fractura es significativamente mayor en el hueso humano⁽¹⁵⁰⁾.

Material	Módulo de elasticidad (GPa)	Resistencia a la compresión (MPa)	Resistencia a la flexión (MPa)	Resistencia a la fractura (MPa/m ²)
Hueso humano	7-30	100-300	50-150	2-6
HA	86-110	500-1000	115-200	1
Fosfato tricálcico	30-90	400-700	130-160	1
Al ₂ O ₃	300-400	4500	550	3-5

Tabla 14: Comparación de las características mecánicas del hueso humano y de las biocerámicas; GPa: gigapascales; MPa: megapascales.

•**Fosfato Tricálcico (TCP):** es una cerámica sintética que a diferencia de la HA es menos cristalina y más amorfa siendo, por ello más reabsorbible. Existen dos formas básicas comercializadas, la α -TCP y la β -TCP. Mecánicamente su comportamiento es similar o ligeramente más fuerte que el del hueso trabecular a las fuerzas de compresión, pero es frágil ante fuerzas de torsión o cizallamiento. Se reabsorbe aproximadamente entre las 6 y las 18 semanas tras su implantación, mediante reabsorción osteoclástica y aposición de hueso neoformado y se comercializa en forma de bloques y partículas de diferentes tamaños y formas. Se hallan disponibles también compuestos bifásicos o mezclas de HA y TCP en proporciones variables que pretenden complementar la resistencia mecánica de la HA con la mayor reabsorción del TCP.

Matriz ósea.	Resistencia a la compresión.	Velocidad de reabsorción.	Ventajas.	Inconvenientes.
Sulfato cálcico	Similar al hueso	Muy rápida (10 semanas)	Barato. Puede inyectarse.	Puede crear seromas.
Hidroxiapatita (HA)	Ligeramente superior.	Lenta reabsorción.	Osteointegración. Buen transportador.	Frágil
Fosfato tricálcico (TCP)	Ligeramente superior.	Rápida (6-18 semanas).	Disponible en muchas formas y tamaños.	Frágil.
Cemento de fosfato cálcico.	Superior.	Lenta (varios años)	Puede inyectarse. Carga precoz.	Puede diseminarse.
Matriz colágeno + hidroxiapatita.	Inferior.	Variable según contenido de HA.	Buen transportador.	Alergia a colágeno de origen animal.

Tabla 15: Sustitutos óseos cerámicos en cirugía ortopédica y traumatología.

4.2.1.3. HIDROXIAPATITA A ESCALA NANOMÉTRICA COMO SUSTITUTO ÓSEO

En los últimos años la hidroxiapatita con un tamaño nanométrico o nanoHA (10–100 nm) ha sido objeto de muchos estudios dentro del campo de la ingeniería tisular y los sustitutos óseos debido a sus propiedades funcionales superiores en comparación con la hidroxiapatita a microescala usada tradicionalmente^(62, 122, 228, 246). Estas diferencias se centran fundamentalmente en una mayor reactividad en su superficie y en su estructura ultrafina. En este tiempo se han centrado muchos esfuerzos en la síntesis y procesamiento de nanoHA y de diferentes biocompuestos con la misma, con el objetivo de obtener estructuras ultrafinas que presentasen unas propiedades físicas, mecánicas, químicas y biológicas sustancialmente diferentes de las observadas con las formulaciones micrométricas, y que al mismo tiempo fuesen análogas a las del mineral óseo natural. El empleo de un material de escala nanométrica implica un gran aumento de superficie específica sobre la que pueden actuar las células y macromoléculas del organismo. El procesamiento nanoestructural mejora la sinterización de la HA e incrementa la fiabilidad mecánica de la misma reduciendo la imperfección por la variabilidad de su tamaño⁽¹⁴⁾.

Los cristales de hueso se disponen en nanoestructuras con forma de agujas uniformemente dispuestas formando una matriz polimérica. La interacción existente entre estos cristales naturales y el ambiente fisiológico en que se encuentran no es bien conocida; sin embargo se ha comprobado que los cristales naturales de hueso presentan una respuesta más activa frente al ambiente circundante en comparación con los materiales o sustitutos sintéticos. Uno de los motivos de esta situación puede deberse a la pobre cristalinidad de los cristales naturales y a las características propias de la nanoestructura, ya que aumentan las áreas de contacto, degradación y re-deposición ósea⁽¹⁵⁰⁾. Ha quedado demostrado también que la nanoHA, en comparación con la microHA, favorece la adhesión, diferenciación y proliferación de los osteoblastos, la osteointegración, y el depósito de mineral de calcio en su superficie, todo lo cual contribuye a aumentar la formación de nuevo tejido óseo a una mayor velocidad⁽²⁶⁹⁾.

Obtención y síntesis de nanoHA.

La HA puede extraerse directamente del tejido óseo, o bien puede producirse de manera artificial mediante la precipitación directa de iones calcio y fosfato.

En la literatura se han descrito diferentes métodos para preparar cristales de nanoHA de manera artificial (tablas 16 y 17). Esencialmente existen dos procesos principales para su obtención: métodos en estado húmedo y en estado sólido o seco. La síntesis en estado seco produce nanopartículas con alta cristalinidad, pero necesita altas temperaturas para su síntesis (cerca de los 700 °C) y largos periodos de tiempo. Además, la HA así obtenida necesita ser molida ya que se forman conglomerados de mayor tamaño. Por contra la síntesis en estado húmedo requiere temperaturas relativamente bajas y produce nanopartículas de una forma más sencilla, aunque su cristalinidad y el ratio Ca/P es relativamente bajo⁽¹⁸⁵⁾. No obstante, la mayoría de los métodos que se emplean en la actualidad siguen el estado húmedo, entre los cuales destacan la precipitación química, el denominado estado sol-gel, la emulsión, o el biomimetismo entre otros.

La síntesis de nanoHA a partir de soluciones acuosas supersaturadas resulta muy ventajosa debido al bajo coste del proceso y a su simplicidad, pero hay que destacar que la mayoría de los métodos empleados hasta el momento concluyen con la formación de productos no estequiométricos⁽¹⁰⁶⁾.

Las dificultades encontradas en la preparación de cristales de nanoHA sintética a partir de soluciones acuosas se deben fundamentalmente a la alta afinidad química del material con ciertos iones como K^{2+} , Na^{2+} , NO^{3-} y Cl^{-} ⁽¹⁰⁶⁾. Es común observar además el denominado fenómeno de “partícula secundaria” (“*secondary particle*”), consistente en la agregación espontánea de los cristales granulados de nanoHA con el consiguiente aumento de tamaño de las partículas nanométricas, para disminuir la entalpía libre del sistema. Este fenómeno puede ser evitado empleando surfactantes con el objetivo de disminuir la tensión superficial de la preparación líquida, permitiendo de este modo una difusión más sencilla y evitando el crecimiento de los cristales⁽⁵²⁾. El SDS (dodecilsulfato sódico, $C_{12}H_{25}NaO_4S$) es el surfactante iónico más utilizado para este propósito⁽¹⁶¹⁾.

La formación de cristales de nanoHA sintéticos a partir de soluciones altamente saturadas tiene lugar a través de precursores intermedios con una existencia temporal tales como β -TCP, deficientes en calcio ⁽¹⁷⁶⁾.

Estado seco o sólido	Reacción en estado sólido ⁽¹³⁹⁾		Mediante reacciones en estado sólido de ortofosfato cálcico con óxido cálcico o con sales relacionadas pueden obtenerse partículas de HA estequiométricas y bien cristalizadas. Requiere altas temperaturas. También puede obtenerse HA no estequiométrica a partir de materiales naturales como huesos bovinos o espinas de pescado.
	Reacción mecano-química ⁽²¹⁹⁾		Consiste en el molido directo de los productos de la fase anterior. Menor cristalinidad, por lo que se requiere un procesamiento final a temperatura entre 500 y 1000 °C. Tamaño de cristal 5-150 nm.
	Plasma-spray o tecnología de plasma térmico ^(131, 281)		La materia prima es parcial o totalmente derretida o evaporada a altas temperaturas. Las partículas así formadas se concentran en partículas ultrafinas tras un enfriamiento rápido.
Estado húmedo	<u>Precipitación química húmeda</u> ^(61, 62)		Mezcla de dos soluciones acuosas de calcio y ortofosfato a un pH>7, resultando soluciones supersaturadas de HA. Rápida precipitación de nanopartículas. Simple. Estudios en fluidos corporales simulados. Formación indirecta a través de precursores deficientes en calcio. Forma y tamaño de nanopartículas dependen de la concentración de reactantes, fuerza iónica, pH y temperatura. Tamaño del cristal 10-100 nm. Es el método más utilizado.
	Conversión hidrotérmica ⁽¹⁴³⁾		Diferentes métodos para cristalizar materiales en un medio acuoso a altas temperaturas (100 -250 °C). Produce partículas nanométricas de HA, de alta cristalinidad y ratio Ca/P cercano al valor estequiométrico. Dos procesos: conversión hidrotérmica y crecimiento hidrotérmico. Tamaño 15-65 nm.
	Precipitación homogénea	Cambio térmico de PH ⁽⁷⁾	Comienza con una solución homogénea de fosfato cálcico ácido, produciéndose la nucleación de HA por la descomposición térmica (hidrólisis) de urea o anfetamina. El NH ₃ resultante eleva el pH, precipitando las partículas de HA.
		Disociación térmica de iones Ca ⁽⁸³⁾	El tratamiento hidrotérmico de una solución homogénea de fosfato cálcico, donde los iones calcio son disueltos por el quelante EDTA, permite la formación de partículas de HA debido a la disociación térmica de Ca-EDTA en soluciones fosfato. Pueden obtenerse cristales de tamaño nanométrico después del calentamiento con microondas.
	Estado sol-gel ⁽²⁶⁰⁾		Usado para fabricar cerámicas de grano fino en condiciones de humedad. Forma un precursor que sufre hidrólisis y reacciones de condensación para formar una fase sólida. Controlando parámetros de las reacciones de la fase sólida pueden obtenerse nanopartículas. Efectivo para fabricar cerámicas nanométricas por sinterización y superficies de recubrimiento en diferentes sustratos.
	Emulsión ⁽¹⁴⁵⁾		Nucleación en un espacio restringido, que se prepara con un sistema inverso de emulsión por goteo.

Tabla 16: Métodos de fabricación de partículas de nanoHA⁽¹⁸⁵⁾.

Ha quedado demostrado que la presencia de iones Cl^- y la precipitación acelerada de los cristales durante su preparación influyen en el tamaño y en la superficie final del mismo, incidiendo también en la pureza del producto y en sus características cristalográficas. Además, el nivel de saturación de reactantes, especialmente la concentración de iones Ca^{2+} , juega un papel predominante en la forma del precipitado final de estas reacciones ácido-base.

La utilización de reactantes de alta pureza, que no dejan iones residuales después de las reacciones químicas, el bajo índice de precipitación y el lento procesado de los compuestos, aumentan la calidad y mejoran las características de los cristales. Durante el procesamiento lento de los cristales tienen lugar fenómenos de disolución y recristalización de los mismos. En esta fase, los cristales de pequeño tamaño desaparecen, aumentando el tamaño de los más grandes. Como consecuencia de estos fenómenos disminuyen el número total de cristales y la rugosidad de su superficie⁽¹⁴⁰⁾, de acuerdo con la ley de maduración de Ostwald que defiende que el número de partículas pequeñas tiende a reducirse mientras que el de partículas mayores tiende a incrementarse⁽²⁶²⁾.

Otra variable pendiente de resolver es la velocidad de adición del reactante, ya que esta afecta al ritmo de nucleación de los cristales de nanoHA: una lenta adición asegura la ausencia de nucleación continua.

Se ha podido demostrar que un incremento en la concentración de los materiales iniciales en seco disminuye el tamaño de los cristales y promueve la formación de partículas de apatita con forma de aguja. El área de la superficie inicial del polvo de $\text{Ca}(\text{OH})_2$ no tiene influencia en el tamaño de las partículas de nanoHA⁽²³⁵⁾.

El biomimetismo es un concepto antiguo que en los últimos años ha retornado a la primera línea del pensamiento científico, y que defiende el examen y análisis de la naturaleza, sus modelos, sistemas, procesos y elementos, e inspirándose en ellos, resolver problemas humanos de una manera sostenible. En el campo de la ingeniería tisular, el término biomimetismo se utiliza para referirse al empleo de los principios biológicos en el diseño humano. En la síntesis de nanoHA, por biomimetismo nos referimos al procesamiento que simula la formación y precipitación de cristales de

nanoHA en un ambiente biológico, empleando en la mayoría de los casos fluidos corporales sintéticos (*synthetic body fluid*, SBF). Con este método, los cristales de nanoHA se sintetizan con concentraciones de iones muy similares a las presentes en el plasma humano, obteniendo una superficie de recubrimiento deficiente en calcio pobremente cristalizado y apatita con iones carbonato (CO_3^{2-}), que es muy similar a la apatita ósea. Este método se basa en la utilización de iones de calcio, disueltos a partir de cerámica cristalina tras su inmersión en SBF, aumentando el grado de saturación de los fluidos corporales circundantes con respecto a la apatita, y el sílice hidratado que se forma en la superficie de la cerámica cristalina y que favorece la nucleación posterior de la apatita. Una vez que la apatita se ha nucleado, es capaz de crecer de manera espontánea en el ambiente fisiológico del cuerpo⁽¹¹⁶⁾.

Método de síntesis.	Tamaño del cristal (nm).	Fuentes de Ca y P.		Condiciones.
Precipitación química ^(29, 173, 267) .	10-100	CaCl ₂ Ca(NO ₃) ₂ Ca(OH) ₂	P(OC ₂ H ₅) ₃ NH ₄ H ₂ PO ₄ H ₃ PO ₄	Baja cristalinidad, homogéneos, 200°C, procesamiento en 24 horas.
Hidrotérmica ^(121, 123, 291)	15-65	Ca(NO ₃) ₂ CaCl ₂ DCPD DCPA Ca(OH) ₂	NH ₄ H ₂ PO ₄ H ₃ PO ₄ (NH ₄) ₂ HPO ₄	Alta cristalinidad, fase de material puro, 50-400°C, procesamiento en 8 horas.
Mecano-química (estado sólido) ^(207, 229)	5-150	Ca(OH) ₂ CaCO ₃ CaHPO ₄ ·2H ₂ O	H ₃ PO ₄ Ca ₂ P ₂ O ₇ CaCO ₃ (NH ₄) ₂ HPO ₄	Nanofibras y nanobarras. HA deficiente en Ca, y de alta cristalinidad. Necesita tratamiento final a altas temperaturas
Biomimetismo ^(170, 237)	50	Ca(OH) ₂ Ca(NO ₃) ₂ ·4H ₂ O Cáscara de huevo	(NH ₄) ₂ HPO ₄	Uso de fluidos humanos simulados. Baja cristalinidad.
Emulsión ^(27, 265)	15-60	CaCl ₂ Ca(OH) ₂ Ca(NO ₃) ₂	Na ₂ HPO ₄ KH ₂ PO ₄ (NH ₄) ₂ HPO ₄ H ₃ PO ₄	Empleo de fases acuosa y oleosa
Sol-gel ^(52, 151, 152)	10-60	Ca(NO ₃) ₂ ·4H ₂ O	P(OCH ₂ CH ₃) ₃ (NH ₄) ₂ HPO ₄ (CH ₃ O) ₃ PO	Resulta en una estructura de grano fino que contiene una mezcla de cristales nanométricos

Tabla 17: Métodos de procesamiento de nanoHA.

Pero hay que destacar que los SBF simulan únicamente la parte inorgánica del plasma humano, y no contienen proteínas, glucosa, vitaminas, hormonas, etc. Por otra

parte, la cantidad de algunos iones en el plasma humano puede variar dependiendo del sexo, edad y estado de nutrición. El interés en la utilización de los SBF en diferentes ensayos *in vitro* y para la preparación de recubrimientos biomiméticos de apatita ha aumentado en los últimos años^(19, 20, 124). De esta forma se han preparado diversas soluciones de SBF, como la revisada (r-SBF) y la modificada (m-SBF), con concentraciones iónicas iguales o muy próximas al plasma humano⁽¹⁸⁹⁾. Sin embargo la preparación de los SBF debe llevarse a cabo bajo estrictas condiciones para evitar la coagulación y precipitación de las sales que puedan influir en los resultados finales.

Otro importante método de síntesis de partículas de nanoHA y que ha atraído mucha atención en los últimos años es el denominado método de sol-gel. Este método permite la mezcla de los precursores de calcio y fósforo a un nivel molecular, lo que permite incrementar la homogenización química de la nanoHA resultante, en comparación con métodos tradicionales en estado sólido. La flexibilidad del método sol-gel supone una gran oportunidad para procesar superficies de recubrimiento muy finas utilizables para aplicaciones biomédicas y mediante un procesamiento simple. En este procesamiento, la temperatura que se necesita para formar la estructura de apatita depende en gran medida de la naturaleza química de los precursores, además de la velocidad de su adición: son necesarias más de 24 horas para lograr estabilizar la nanoHA monofásica así producida. No obstante, y hasta la fecha, no se ha encontrado una explicación para la influencia de la naturaleza química de los precursores en dicha formación⁽⁹⁷⁾.

4.2.2.- Biomateriales orgánicos.

4.2.2.1.- No reabsorbibles

Entre los biomateriales orgánicos no reabsorbibles empleados como sustitutos óseos hay que destacar:

- **Polimetilmetacrilato (PMMA):** el cemento acrílico es el elemento de unión más utilizado en la clínica en la actualidad para conseguir la unión de un implante protésico al hueso. Fue desarrollado en Gran Bretaña por Sir John Charnley en 1958. Sus funciones son asegurar la fijación del implante al hueso, transmitir las cargas que debe soportar la prótesis, conseguir un bloqueo mecánico en las trabéculas óseas y compensar las imperfecciones de la técnica quirúrgica.

El cemento acrílico que se utiliza actualmente consta de dos componentes, uno en polvo (polímero) y otro líquido (monómero). A su vez el polímero está formado por polimetilmetacrilato (con diferentes grados de viscosidad), sulfato de bario (permite que sea radiopaco y pueda visualizarse en las radiografías) y peróxido de benzoilo (que permite la mezcla de los dos componentes principales). Por otra parte, el componente líquido o monómero está formado por metilmetacrilato y los agentes estabilizadores del mismo⁽⁴⁸⁾.

Una vez que se ha producido la mezcla de los dos componentes principales, se inicia la reacción de polimerización, que consta de una fase de mezcla, una fase de trabajo y una fase de endurecimiento, que se suceden de manera encadenada. La temperatura ambiente es el factor más importante que influye en la velocidad de dicha reacción. Entre sus efectos secundarios hay que destacar la necrosis ósea local por efecto de la temperatura, la hipotensión arterial por citotoxicidad en el músculo liso vascular, y la posible microembolia pulmonar con repercusión clínica ocasional. La fijación cementada continúa siendo el “patrón oro” en las artroplastias totales de rodilla y en algunos casos de artroplastia total de cadera, especialmente el componente femoral⁽²⁵⁷⁾.

- **Polietileno (PE):** se trata de un polímero formado por cadenas lineales del monómero etileno o eteno unido repetidas veces consigo mismo mediante enlaces covalentes. Es considerado el biomaterial de referencia utilizado como superficie de fricción en artroplastias debido a sus propiedades autolubricantes, capacidad de absorción de energía, coeficiente de fricción, resistencia a la abrasión, tracción y fatiga, y por su desgaste (0,1-0,2 mm/año en el par CrCo-PE). Para disminuir este desgaste debe utilizarse siempre el componente más duro (metal) en la superficie convexa como es la cabeza femoral o los cóndilos femorales, y el componente más blando (PE) en la superficie cóncava (bandeja tibial o núcleo del cotilo)⁽²¹⁸⁾.

4.2.2.2.- Reabsorbibles o biodegradables. COLÁGENO

Dentro de los biomateriales orgánicos reabsorbibles destaca el colágeno.

- **Colágeno.** Las proteínas más abundantes dentro de la matriz extracelular pertenecen a la denominada familia del colágeno. De esta manera el colágeno es el principal componente de todos los tejidos conectivos, y también lo encontramos en el

tejido intersticial de todos los órganos parenquimatosos, donde contribuye a mantener la integridad física de los diferentes órganos y tejidos. Éstas fibras colágenas presentan una gran variabilidad morfológica y arquitectural como lo demuestra la presencia masiva de fibrillas estriadas en tendones y ligamentos, o las delgadas y no estriadas fibrillas del cartílago hialino, la delicada estructura reticular prevalente en diferentes tejidos conectivos, o los agregados amorfos presentes en diferentes membranas basales. Por otra parte, en determinadas ocasiones el colágeno puede cumplir una función de soporte o andamiaje para diferentes elementos, como por ejemplo los depósitos cristalinos o amorfos de sales de fosfato cálcico, agregados de proteoglicanos o glucoproteínas macromoleculares específicas como la fibronectina.

Tipo de Colágeno		Distribución en el organismo
Colágeno en fibrillas	I	Huesos, dermis, tendones, ligamentos, córnea.
	II	Cartílago, vítreo ocular, núcleo pulposo de los discos intervertebrales.
	III	Piel, paredes vasculares, fibras reticulares de la mayoría de los tejidos (pulmones, hígado, bazo...)
	V	Pulmones, córnea, membranas de hueso fetal; junto con el colágeno tipo I.
	XI	Cartílago, vítreo ocular.
Colágeno de membrana basal	IV	Membranas basales
Colágeno microfibrilar	VI	Dermis, cartílago, placenta, pulmones, paredes vasculares, discos intervertebrales.
Fibrillas de anclaje	VII	Piel, uniones dermo-epidérmicas, mucosa oral, cérvix.
Redes hexagonales formadas por colágeno	VIII	Células endoteliales, membrana de Descemet
	X	Cartílago hipertrófico.
Colágenos FACIT*	IX	Cartílago, humor vítreo, córnea.
	XII	Pericondrio, ligamentos, tendones.
	XIV	Dermis, tendones, paredes vasculares, placenta, pulmones, hígado.
	XIX	Rabdomiosarcoma humano.
	XX	Epitelio corneal, piel embrionaria, cartílagos, tendones.
	XXI	Paredes vasculares.
Colágenos transmembranosos	XIII	Epidermis, folículos pilosos, intestino, condrocitos, pulmones, hígado.
	XVII	Uniones dermo-epidérmicas.
Multiplexins **	XV	Fibroblastos, músculo liso, riñones, páncreas.
	XVI	Fibroblastos, amnios, queratinocitos.
	XVIII	Pulmones, hígado.

Tabla 18: Tipos de colágeno y su distribución en el organismo. * Colágenos FACIT: *Fibril Associated Collagens with interrupted triple hélices*. ** Multiplexins: *Multiple triple-helix domains and interruptions*. Adaptado de⁽⁸⁶⁾.

Se han identificado alrededor de 28 tipos de colágeno diferentes, siendo el colágeno tipo I el más prevalente encontrado en la matriz extracelular, especialmente en tejidos como tendones y huesos (tabla 18). Un conocimiento más profundo y exhaustivo de la expresión y función del colágeno contribuye a un mejor conocimiento de

enfermedades que se basan en defectos moleculares de los genes de esta proteína, tales como diferentes displasias condrales, osteogénesis imperfecta, síndrome de Alport, síndrome de Ehler-Danlos o epidermólisis bullosa. Por otra parte la degradación del colágeno y un metabolismo anómalo del mismo se encuentran en la base del desarrollo de la artrosis y la osteoporosis^(21, 261).

Estructura y función del colágeno. En las últimas décadas la familia de proteínas colágenas se ha expandido de una manera muy marcada como puede verse en la tabla 18⁽⁸⁶⁾. Todos los miembros de esta familia se caracterizan por presentar dominios con repeticiones del Gly-X-Y (sieno X frecuentemente prolina), formando estructuras colágenas de triple hélice. Las fibrillas de colágeno están compuestas por tres subunidades de cadenas α , unidas en una triple hélice dextrógira de colágeno. Cada cadena α a su vez está formada por aproximadamente 1000 residuos de aminoácidos.

Basándonos en su estructura y organización supramolecular, los colágenos pueden agruparse en diferentes tipos como puede verse en la tabla 18, que se caracterizan por su diversidad y complejidad estructural, presencia de dominios adicionales no helicoidales, ensamblaje o modo de unión, y función principalmente. La familia más abundante y extendida es la del colágeno en fibrillas, ya que supone aproximadamente el 80% del colágeno total del cuerpo. Los colágeno tipos I y V contribuyen a la estructura ósea, y los tipos II y XI se encuentran fundamentalmente en la matriz fibrilar del cartílago articular⁽⁸⁶⁾.

El conocimiento exhaustivo de la estructura del colágeno y de sus propiedades físicas y bioquímicas ha contribuido a su utilización como biomaterial en una amplia variedad de aplicaciones. El colágeno es un excelente sustrato para las células, las cuales pueden reconocerlo y unirse al mismo a través de integrinas⁽²⁷⁶⁾. Por otra parte las células pueden degradarlo mediante la secreción de enzimas específicos, y pueden sintetizar nuevo colágeno de forma intracelular, procesos de vital importancia para mantener la homeostasis de muchos órganos y tejidos⁽²⁶⁶⁾. Además de estas cualidades, su alta porosidad, facilidad de combinación con otros materiales, la facilidad para su procesamiento y baja antigenicidad lo convierten en un biomaterial con un alto potencial en la ingeniería tisular ósea^(43, 73).

El colágeno de tipo I, formado por un heterotrímero de dos cadenas idénticas $\alpha 1$ y una cadena $\alpha 2$, es el colágeno más abundante y mejor estudiado, constituyendo más del 90% de la masa orgánica del hueso y siendo el colágeno principal de tendones, piel, ligamentos, córnea, y muchos tejidos conectivos intersticiales con la excepción del cartílago hialino, cerebro y humor vítreo. En la mayoría de estas ocasiones aparece combinado con colágeno de tipo III. El colágeno de tipo I confiere a los órganos donde está presente sus importantes propiedades biomecánicas de carga, resistencia a la tensión y a las fuerzas torsionales, especialmente después de su calcificación en el tejido óseo⁽⁷⁶⁾.

El colágeno tipo III es un homotrímero de tres cadenas idénticas $\alpha 1$, y se encuentra ampliamente distribuido en el organismo en combinación con el colágeno tipo I, siendo un importante componente de las fibras reticulares del tejido intersticial de los pulmones, hígado, dermis, bazo y paredes vasculares.

Las proteínas colágenas tienen la función principal de mantener la integridad estructural de los diferentes órganos y tejidos del cuerpo. Sin embargo también tienen un papel importante en la introducción, almacenaje y liberación de diferentes factores de crecimiento, como el IGF-I e IGF-II, y citoquinas, desempeñando de esta manera una función fundamental durante la organogénesis, la reparación tisular y la cicatrización^(103, 282).

Preparación de soportes de colágeno poroso como sustituto óseo. Todos los órganos y tejidos del organismo presentan una organización tridimensional de su matriz extracelular en la que se disponen y alinean las diferentes células. Las proteínas colágenas son el componente más ubicuo y abundante en los mamíferos, y aportan resistencia e integridad estructural a todos los órganos, incluyendo la piel, los tendones y el tejido óseo. De esta forma, los andamios de biomateriales utilizados con una estructura tridimensional específica de un tejido, mimetizando su matriz extracelular, tienen un gran potencial en el campo de la actual ingeniería tisular.

El colágeno tipo I es el más utilizado en el campo de la ingeniería tisular ósea y aquel cuyo proceso de obtención se encuentra más documentado^(67, 82). Diferentes

tejidos como la piel o los tendones son ricos en fibras colágenas y se utilizan como fuente para su utilización en ingeniería tisular ósea. Estas fuentes animales o humanas, como el tendón de Aquiles, necesitan diferentes procesos bioquímicos de decalcificación, purificación y modificación hasta obtener colágeno de alta pureza⁽²⁶³⁾.

Entre los procesos para la extracción y purificación de colágeno tipo I a partir de diferentes tejidos de origen animal, destacan los tratamientos ácidos (disolución en ácido acético), tratamientos alcalinos (utilizando normalmente soluciones de NaOH) y los procedimientos proteolíticos, seguidos a continuación del tratamiento con sales neutras, diálisis, precipitación y centrifugación⁽⁷³⁾. Estos procesos son necesarios para disminuir la capacidad antigénica de las proteínas, y evitar reacciones en el receptor.

El colágeno de tipo I se ha utilizado como biomaterial en una gran cantidad de aplicaciones diferentes debido a sus múltiples propiedades, entre las que destacan sus características biomecánicas y su baja antigenicidad⁽⁶⁷⁾.

Ventajas	Desventajas
<ul style="list-style-type: none"> -Biocompatible. -Osteocompatible. -Mínimo potencial de antigenicidad tras retirar los telopéptidos terminales. -Adhesividad. -Suturable. -Fácil incorporación de sus fibras al tejido circundante. -Alta porosidad que facilita la neohistogénesis. -Combinación con otros materiales. 	<ul style="list-style-type: none"> -Escasa rigidez. -Potencial antigenicidad por telopéptidos.

Tabla 19: Propiedades del colágeno como sustituto óseo⁽⁸⁹⁾.

Entre los inconvenientes que se encuentran en la utilización del colágeno como sustituto óseo hay que destacar los altos costes de su manufactura (debido al tiempo consumido y los procedimientos complejos de purificación) y la dificultad en evitar la desnaturalización del mismo.

El colágeno puede ser modificado y fabricado con diferentes formas, tales como partículas de polvo, fibras, geles, soluciones, membranas, esponjas o biocompuestos con materiales cerámicos⁽⁷³⁾. En el diseño y fabricación de los andamios de colágeno existen una serie de parámetros que desempeñan un papel fundamental en las propiedades

biomecánicas de los mismos⁽⁶⁷⁾ y que son de crucial importancia para el funcionamiento de órganos y tejidos: la estructura y correcta orientación de las fibras y fibrillas, el tamaño del poro y la porosidad total⁽¹⁸²⁾.

La estructura de los andamios puede controlarse de una manera directa mediante los procesos de congelación y de transferencia de calor que tienen lugar durante su fabricación⁽¹⁸²⁾. Diferencias en la cantidad del calor transferido durante el procesamiento de congelación de la suspensión de colágeno pueden tener un gran efecto en la microestructura final de los andamios. Si la velocidad de enfriamiento es lo suficientemente rápida para obtener todo el calor del proceso de cristalización que se inicia de forma simultánea en toda la suspensión de colágeno, tiene lugar la formación de numerosos cristales de hielo de pequeño tamaño, obteniéndose poros pequeños. En caso contrario si la velocidad de enfriamiento no es lo suficientemente rápida, la formación de los cristales de hielo es más lenta siendo los mismos de mayor tamaño^(220, 297).

La porosidad y el tamaño del poro de los andamios utilizados como biomateriales desempeñan un papel fundamental en la formación ósea en estudios *in vitro* e *in vivo*⁽¹⁸³⁾, y se ha podido demostrar que el tamaño del poro del andamio correspondiente influye de manera directa en la actividad celular. En experimentos *in vitro* se ha comprobado que una baja porosidad estimula la osteogénesis al favorecer la agregación celular. Por contraste, en los experimentos *in vivo* una mayor porosidad y tamaño del poro se asocian con un mayor crecimiento óseo, pero a expensas de disminuir sus propiedades mecánicas. De esta forma, la temperatura de congelación utilizada en la síntesis de los andamios de colágeno, es una variable importante que influye en el tamaño del poro y que debe ser incluida para su estudio y valoración en el proceso de síntesis de los andamios.

Según diferentes estudios 100 μm sería el tamaño mínimo requerido del poro teniendo en cuenta la migración, el transporte y el tamaño celular. Tamaños de poro superiores a 300 μm favorecen el paso de capilares a través permitiendo una osteogénesis directa, frente a tamaños inferiores que producirían condiciones hipóxicas y conducirían a una génesis osteocondral⁽¹²⁶⁾. No obstante el tamaño ideal del poro que facilita la máxima entrada de células en su interior⁽⁵³⁾ así como la adhesión y el depósito

celular en su matriz varía con los diferentes tipos celulares^(60, 248). Existe evidencia probada de que el tejido neoformado en un andamio con un tamaño de poro uniforme presenta unas propiedades biomecánicas superiores en comparación con el tejido formado en andamios con diferente tamaño de poro^(111, 296).

Andamios de colágenos entrecruzados. Una cuestión capital en el proceso de formación de un tejido polimérico empleado como andamio es el proceso de ensamblaje de dicho polímero, y que se conoce como entrecruzamiento. En este proceso tiene lugar la formación de enlaces iónicos y covalentes entre las cadenas individuales de estos polímeros. Y para que tenga lugar se necesita bien un radical o un ion para promover el proceso, junto con un iniciador que puede ser el calor, la luz, un acelerante químico, o el tiempo. La principal ventaja de los polímeros entrecruzados es que con frecuencia presentan unas propiedades mecánicas significativamente mejoradas. Por contra la principal desventaja es la posible citotoxicidad derivada de algunos procesos de entrecruzamiento. Los diferentes componentes utilizados en la formación de los polímeros entrecruzados así como las reacciones químicas necesarias pueden requerir la utilización de componentes citotóxicos o la formación de subproductos que lo sean⁽²⁸⁹⁾.

Pueden utilizarse métodos físicos o químicos para realizar el entrecruzamiento de estos andamios. Las fibras de colágeno que han sido reticuladas químicamente disminuyen su susceptibilidad frente a la digestión enzimática *in vitro*, y también se reduce la degradación *in vivo* de las mismas cuando se realiza la implantación subcutánea en ratas adultas tipo Wistar^(196, 198), pero tienen un riesgo asociado de toxicidad potencial debido a las moléculas o compuestos residuales que se producen en este proceso⁽⁸²⁾. Por su parte la reticulación física mediante deshidratación térmica (DHT) a 110°C bajo condiciones de vacío o mediante una exposición controlada a luz ultravioleta tiene menos riesgo de producir productos tóxicos, pero tiene el inconveniente de una reticulación limitada y la posibilidad de producirse una desnaturalización parcial del colágeno. Se ha demostrado que estos métodos de reticulación aumentan el módulo de Young, la resistencia a una hiperhidratación y la resistencia a la digestión enzimática⁽²⁶⁸⁾ y proporcionan nuevas vías para mejorar las propiedades físico-químicas de los andamios utilizados en ingeniería tisular.

Alguno de los diferentes agentes químicos empleados para lograr el entrecruzamiento polimérico son el imidoéster dimetil suberimidato, el NHS (N-hidroxisuccinamida) y el formaldehído. Cada uno de estos agentes induce un ataque nucleofílico del grupo amino de la lisina y la consiguiente formación de un enlace covalente. El EDC, EDAC o EDCI, acrónimos para designar el 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida, es una carbodiimida soluble en agua. Los principales usos para esta carbodiimida incluyen la síntesis peptídica, el entrecruzamiento de proteínas ácidas nucleicos y la preparación de inmunocompuestos. El EDC se utiliza normalmente en combinación con NHS para incrementar la eficacia del acoplamiento o crear un producto entrecruzado estable mediante la conversión de enlaces carboxilos en otros intermedios amino-reactivos que se unen a los residuos de lisina u otros enlaces amino disponibles.

Material	Método de entrecruzamiento	Referencias
Tratamiento físico		
Colágeno bovino cutáneo	DHT a diferentes temperaturas y con vacío	Gorham ⁽⁹³⁾ , 1992
Colágeno bovino cutáneo	Irradiación ultravioleta diferentes longitudes de onda, tiempo y atmósfera	Miyata ⁽¹⁶⁵⁾ , 1971 Torikai y Shibata ⁽²⁴⁴⁾ , 1999
Tratamiento químico		
Andamios de colágeno	Difenilfosforilazida (DPPA)	Vaissiere ⁽²⁵⁵⁾ , 2000 Roche ⁽²¹⁰⁾ , 2001
Colágeno ovino cutáneo Colágeno bovino pericárdico	1-etil-3(3-dimetilaminopropil)- carbodiimida (EDC)	Damink ⁽¹⁸⁸⁾ , 1996 Lee ⁽²³¹⁾ , 1996
Colágeno ovino cutáneo Colágeno porcino cutáneo	Glutaraldeído (GA)	Damink ⁽⁵⁴⁾ , 1995 Kikuchi ⁽¹³⁴⁾ , 2004

Tabla 20: Métodos físicos y químicos utilizados para el entrecruzamiento del colágeno en la bibliografía⁽²⁶³⁾. DHT: tratamiento deshidrotérmico

4.3.- NANOCOMPUESTOS DE HIDROXIAPATITA Y COLÁGENO COMO SUSTITUTOS ÓSEOS.

El tejido óseo es un compuesto natural que contiene fibrillas de colágeno y nanocristales de hidroxiapatita con una organización jerárquica. Es un tejido complejo y altamente especializado presentándose sus diferentes componentes en una escala nanométrica, y con la propiedad de autorregenerarse y autorremodelarse a lo largo de los años sin dejar tejido cicatrizal⁽³²⁾. Descendiendo en este compuesto a la menor escala posible, las triples hélices de colágeno forman de manera espontánea uniones

nanométricas, que actúan como plantillas para la cristalización de los nanocristales de HA (figura 15)⁽²⁹⁵⁾. La fabricación de materiales artificiales que mimeticen la estructura y propiedades del hueso natural supone un importante desafío por el hecho de implicar componentes orgánicos e inorgánicos de tamaño nanométrico con una relación espacial muy específica⁽²⁹⁴⁾.

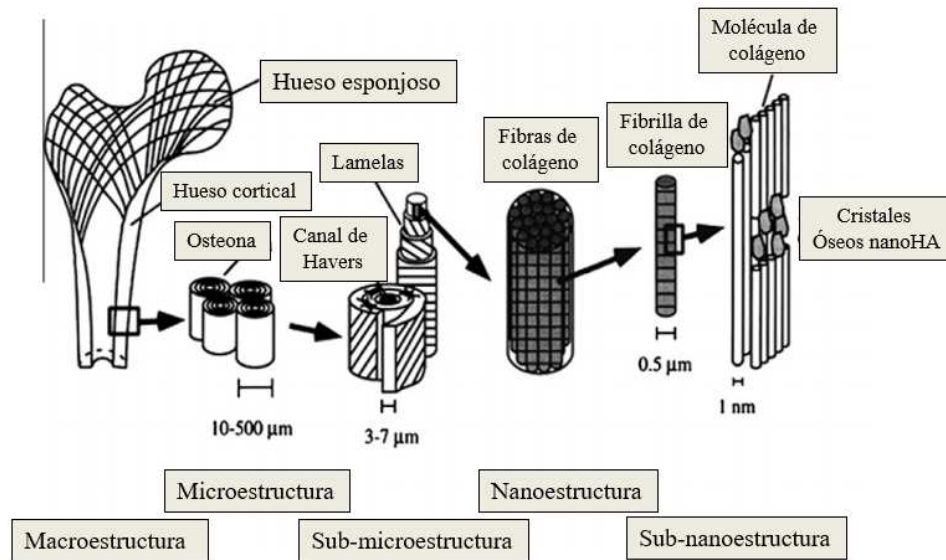


Figura 15: Estructura ósea a diferentes escalas. A nivel nanométrico, la unidad estructural está compuesta por fibrillas de colágeno con nanocristales de HA. Adaptado de Zhou y cols⁽²⁹⁵⁾.

Los denominados materiales monofásicos que se desarrollaron en un primer momento en el campo de la ingeniería tisular ósea no siempre proporcionan todas las características esenciales necesarias para estimular el crecimiento óseo del tejido huésped. Por este motivo existe una gran necesidad de desarrollar materiales multifásicos o compuestos, con una estructura y composición similares al tejido óseo natural⁽¹⁷⁵⁾.

Se han fabricado sustitutos óseos compuestos de HA y diferentes polímeros, en una escala micrométrica, incluyendo ácido poliláctico⁽²⁷²⁾, gelatina⁽¹³⁶⁾, quitosano⁽²⁹³⁾ y colágeno⁽²¹¹⁾, demostrando buenos resultados en estudios *in vitro* y/o *in vivo*, y presentando en conjunto unas propiedades osteoconductoras superiores al polímero empleado de manera aislada. Presentan excelentes propiedades de biodegradación, biocompatibilidad y resistencia mecánica, acelerando al mismo tiempo la osteogénesis⁽²⁸⁰⁾. La adición de HA a estos polímeros naturales ha demostrado aumentar

la bioactividad y las propiedades mecánicas en comparación con el empleo del polímero monofásico. Estos compuestos formados a partir de polímeros biodegradables deben diseñarse idealmente para ser reabsorbidos a una velocidad que permita la transferencia de cargas mecánicas al tejido óseo que se está formando. Además, tanto el polímero como sus productos de degradación no deben desencadenar reacciones inmunógenas y debe reabsorberse por completo. De este modo Higashi y cols^(11, 107) observaron una formación ósea aumentada y acelerada con el empleo de un compuesto de ácido poliláctico e HA en un modelo animal generando defectos óseos en el fémur de ratas en comparación con andamios de ácido poliláctico exclusivamente. De manera similar, Tang y cols⁽²³⁶⁾ han presentado buenos resultados de regeneración ósea en defectos craneales de conejos raza Nueva Zelanda con el empleo de un compuesto de quitosano e HA.

En los últimos años se ha desarrollado un creciente interés por los diferentes métodos de fabricación de compuestos formados por cristales con un tamaño nanométrico. Son los denominados nanocompuestos, combinación heterogénea de dos o más materiales en la cual al menos uno de dichos materiales debe tener un tamaño nanométrico, y que presentan una gran variedad de aplicaciones biomédicas^(149, 273). Es posible que a corto plazo los nanocompuestos tengan un papel primordial dentro de la ingeniería tisular ósea como una nueva clase de sustituto óseo, bien sea empleando una combinación de diversos sustitutos de tamaño nanométrico de forma aislada o en combinación con factores de crecimiento osteoinductores y componentes celulares osteogénicos.

Los nanocompuestos, fabricados fundamentalmente con HA y colágeno, han ganado un gran reconocimiento como sustitutos óseos debido tanto a la similitud en su composición y estructura con el hueso natural como a sus propiedades funcionales, proporcionando un mayor área de contacto y resistencia mecánica, en comparación con sus componentes en solitario⁽¹⁰¹⁾. Se ha demostrado que las células óseas tienen una mayor predisposición para adherirse, crecer, proliferar y diferenciarse cuando las reacciones tienen lugar en una escala nanométrica, adquiriendo de esta manera la topografía nanoestructural un papel crítico para mejorar la osteoconducción y osteoinducción local^(102, 269-271). Los resultados de estos estudios sugieren por tanto que la topografía nanométrica de los compuestos empleados en ingeniería tisular ósea

estimula la neoformación ósea y mejora la integración hueso-implante, consiguiendo un mejor tejido de reparación y una mejor regeneración en la superficie de contacto^(15, 278).

4.3.1.- Aplicaciones actuales de los compuestos de colágeno e hidroxiapatita

Cuando se produce una pérdida ósea debido a algún traumatismo o enfermedad, el defecto generado tradicionalmente era rellenado con hueso natural debido a que los materiales artificiales existentes solían presentar problemas de afinidad biológica. Pero la utilización de hueso natural o aloinjerto no está exenta de ciertos problemas como son su procesamiento y almacenaje, o la posible transmisión de enfermedades infecciosas. Si existiese algún tipo de material artificial que presentase las mismas propiedades biológicas que el hueso podría reemplazar al aloinjerto como sustituto óseo. Con este objetivo, Kikuchi y cols.⁽¹³³⁾ sintetizaron un compuesto de hidroxiapatita y colágeno que presentaba una organización nanoestructural similar al tejido óseo.

Por otra parte, los principales problemas en el tratamiento de las osteomielitis se deben a la pobre llegada y distribución del antibiótico en el foco infeccioso, debido fundamentalmente a la limitada circulación en el tejido esquelético. En las últimas décadas se han mejorado las técnicas de tratamiento en este campo, centrando muchos esfuerzos en los sistemas de transporte y distribución de antibióticos con el desarrollo de biocerámicas y de diferentes polímeros sintéticos y naturales. La obtención de compuestos de colágeno e hidroxiapatita empleados para la liberación prolongada y mantenida de antibióticos puede suponer un importante avance en el tratamiento de la osteomielitis, ya que se ha comprobado que la liberación del antibiótico coincide con la reabsorción del biocompuesto transportador, permitiendo y facilitando de esta manera la consolidación del foco⁽¹⁶⁰⁾.

También se han realizado diferentes trabajos que demuestran su superioridad mecánica y biológica en comparación con un equivalente de colágeno aislado. De esta manera, Song *et al* han fabricado una membrana biomédica con colágeno e hidroxiapatita en un nanocompuesto que presenta unas características mecánicas, químicas y biológicas superiores a las del colágeno aislado⁽²²⁵⁾.

Por su parte, Whal et al.⁽²⁶⁴⁾ han fabricado andamios con colágeno de tipo I, añadiendo hidroxiapatita y en otros casos sin la misma. Según la temperatura crítica de

secado utilizada han podido conseguir un tamaño medio determinado de sus poros, de entre 44 -135 μm . Al mismo tiempo han conseguido formar microcanales en estos andamios mediante un proceso denominado “fabricación sólida espontánea” (SSF, *solid freeform fabrication*). Se ha visto que mediante este proceso se puede conseguir reducir las diferencias observadas normalmente en la fabricación de otros andamios.

Zhang et al.⁽²⁹²⁾ por su parte han diseñado una estructura a base del autoensamblaje de nanofibrillas de colágeno mineralizado que mimetizan la matriz extracelular. Los cristales de HA se depositaron en la superficie de estas fibrillas orientándose longitudinalmente con el eje de las mismas.

4.3.2.- Métodos de síntesis de compuestos de colágeno-HA.

Se han descrito diferentes métodos de síntesis de compuestos de colágeno-HA en la literatura. En la tabla 21 se detallan los principales⁽²⁶³⁾:

1.- Mineralización del colágeno in vitro.	Consiste en la mineralización directa de un sustrato de colágeno utilizando soluciones de calcio y de fosfato ⁽³³⁾ . Se ha podido comprobar que si se reúnen las condiciones ideales de mineralización se puede producir la deposición de los cristales de HA en el mismo eje que la dirección de las fibras de colágeno. Estas condiciones (pH 8-9 y temperatura 40 °C) promueven la acumulación de iones de calcio en el grupo carboxílico de las moléculas de colágeno, favoreciendo de esta manera la deposición y nucleación de la HA.
2.- Activación térmica del ensamblaje de geles colágeno-HA.	Los liposomas pueden actuar como sistemas de liberación de sustancias por su capacidad de contener materiales hidrosolubles. En este método se combina la mineralización directa con la capacidad que poseen los liposomas. Los iones calcio y fosfato son encapsulados en liposomas para posteriormente añadirse a una suspensión ácida de colágeno. Tras inyectarse en un defecto óseo, el aumento de temperatura corporal activa el proceso de gelificación, formando una red fibrosa de colágeno donde tiene lugar la mineralización a 37 °C ⁽¹⁹³⁾ .
3.- Infiltración al vacío de colágeno sobre una matriz cerámica.	La colada múltiple en cinta es un método de producción de sustitutos de cerámica: una suspensión acuosa de hidroxiapatita que contiene esferas de polibutímetacrilato (PBMA) se calienta a altas temperaturas para quemar las partículas de PBMA, formándose una estructura de HA porosa ⁽²⁷⁴⁾ . A continuación se realiza una infiltración de colágeno al vacío sobre esta estructura, de forma que la suspensión de colágeno rellena los huecos de la matriz porosa. El compuesto final es liofilizado entonces para crear microesponjas. La variación en el producto final depende del tiempo de procesado y de la resistencia al flujo durante la infiltración ⁽²⁶³⁾ .
4.- Mineralización enzimática de láminas de	Se ponen en contacto láminas de colágeno con fosfatasa alcalina, con una solución acuosa de iones de calcio y éster de fosfato. La enzima proporciona un reservorio para los iones PO_4^{3-} para que el fosfato de calcio se cristalice, observándose que la

colágeno	mineralización tiene lugar solamente en estas áreas recubiertas. La muestra se vuelve a revestir de nuevo con una suspensión de colágeno, es secada al aire y se entrecruza mediante irradiación UV. Al repetir este ciclo se obtienen láminas compuestas multicapa de calcio / fosfato y colágeno, con un espesor de 7 μm ⁽²⁸⁴⁾ .
5.- Sistema de emulsión de agua en aceite.	Se mezcla una suspensión de colágeno purificada con polvo de HA a 4°C en aceite de oliva y se agita a 37°C. El colágeno se agrega a las gotitas acuosas. Se añade una solución salina tamponada con fosfato (PBS) para formar perlas de gel. Este método tiene el inconveniente de no ser capaz de eliminar totalmente el contenido de aceite del material compuesto ⁽¹¹³⁾ . Se han conseguido fabricar microesferas de colágeno-HA o perlas de gel para rellenos óseos inyectables.
6.- Formación de andamios por liofilización y por secado de puntos críticos (<i>critical point drying</i>, CPD).	<p>Permiten fabricar matrices porosas de tipo esponja. A partir de una suspensión que contiene colágeno, HA y agua, se puede someter a un proceso de congelación a una velocidad controlada para producir cristales de hielo con fibras de colágeno en sus intersticios. Al aplicar un proceso de liofilización, los cristales de hielo se transforman en vapor de agua a una temperatura y presión específicas por sublimación. En el caso del CPD, el líquido y el vapor se vuelven indistinguibles por encima de cierta presión y temperatura, donde las densidades de las dos fases convergen y se vuelven idénticas.</p> <p>El secado por liofilización y el secado en puntos críticos son las técnicas que presenta menos problemas con los residuos de disolventes en comparación con otras técnicas de fabricación de andamios⁽¹⁴⁴⁾. Con estos métodos, el tamaño de poro se determina mediante la formación de cristales de hielo. El cambio de la velocidad de congelación y la solubilidad de la suspensión, así como la concentración de colágeno, pueden alterar el tamaño de los poros. Disolventes adicionales (ácido etanoico, etanol) pueden crear una solidificación adicional del colágeno, y menores grados de congelación pueden generar poros de mayor tamaño⁽¹⁸²⁾. Como hemos comentado con anterioridad, el tamaño del poro es importante en los andamios, ya que determinarán la adhesión y migración celular, las propiedades mecánicas y las posibilidades de éxito de la formación de nuevos tejidos. Karageorgiou y Kaplan⁽¹²⁶⁾ recomendaron que los andamios utilizados como biomateriales deberían tener tamaños de poro de más de 200 μm para favorecer la osteogénesis directa y la vascularización de los mismos.</p>
7.- Fabricación de andamios compuestos sólidos.	<p>En la actualidad pueden fabricarse andamios específicos mediante impresoras tridimensionales previa planificación con ordenador. En la técnica original de Sachlos⁽²¹⁴⁾ se dibuja en primer lugar un modelo mediante diseño asistido por ordenador, imprimiéndose un molde preliminar. Sobre este molde se añade una mezcla de colágeno-HA fundido y es congelado a continuación. Posteriormente los cristales de hielo son sustituidos por etanol, y tras alcanzar el punto crítico de secado, se obtiene una réplica porosa exacta del original.</p> <p>Recientemente se han desarrollado diferentes técnicas de fabricación de formas libres sólidas con polímeros artificiales y materiales cerámicos^(115, 234). Algunas de las ventajas de los andamios de colágeno-HA producidos a través de este método es la capacidad de controlar diferentes variables: la estructura externa e interna, la interconectividad, el tamaño y la forma de los poros y el entrecruzamiento.</p>

Tabla 21: Principales métodos de síntesis de compuestos de colágeno-nanoHA⁽²⁶³⁾.

4.3.3.- Ligandos de unión de los compuestos colágeno-HA.

En el tejido óseo nos encontramos los nanocristales de HA, con un tamaño aproximado de 4 x 50 x 50 nm, unidos indirectamente al colágeno mediante proteínas no colagenosas como la osteocalcina, osteopontina u osteonectina. Estas proteínas representan el 3-5% del contenido del hueso, y proporcionan sitios activos para la mineralización y la adhesión celular⁽¹⁷⁴⁾. La HA natural que aparece en el tejido óseo no se presenta en un estado puro, conteniendo iones como CO_3^{2-} y trazas de Na^+ , Mg^{2+} , Fe^{2+} , Cl^- o F^- .

Un material compuesto o multifásico esta formado al menos por dos componentes, separados por una interfaz. Las propiedades de estos compuestos dependen de un gran número de factores, como la forma, el tamaño, la distribución, el porcentaje o la dispersión de cada componente. En el caso de los compuestos de colágeno e HA utilizados como sustitutos óseos, la fuerza y el grado de unión entre ambos componentes es otro factor muy importante a tener en cuenta en su fabricación. La pérdida de la adherencia entre ambos puede resultar en un fallo precoz del compuesto y en una disminución de sus propiedades mecánicas. Esta adherencia se relaciona con la capacidad hidrofóbica o hidrofílica, y con la tensión superficial de ambos materiales⁽²³²⁾.

Para la fabricación de estos compuestos es preferible utilizar cristales de HA con formas irregulares frente a cristales esféricos. Se ha comprobado que durante el proceso de fabricación, el colágeno fundido puede penetrar con mayor facilidad en las superficies irregulares de las partículas de HA durante el procesado a altas temperaturas, formando de esta manera enlaces mecánicos. Por contra la superficie lisa de las partículas esféricas no favorece estas interconexiones mecánicas⁽²³²⁾.

Desde un punto de vista bioquímico se pueden diferenciar dos tipos de unión de una sustancia inorgánica en un polímero orgánico, según la intensidad de la interacción entre sus componentes: uniones fuertes (covalentes, iónicas), y uniones débiles (fuerzas de van-der-Waals, uniones de hidrógeno, balance hidrofílico-hidrofóbico). Y pueden establecerse cuatro tipos diferentes de interacciones entre las nanopartículas y las cadenas poliméricas con mayor fuerza de unión, según la clasificación de

Kickelbick⁽¹³²⁾: partículas inorgánicas incrustadas en un polímero inorgánico; incorporación de las partículas mediante uniones a la matriz principal; redes interconectadas mediante uniones químicas; polímeros híbridos orgánico-inorgánico.

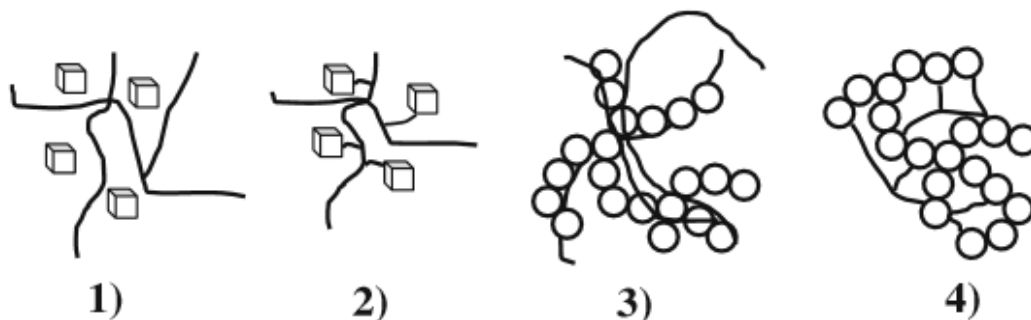


Figura 16: Tipos de anclajes de nanopartículas en una cadena polimérica^(132, 232). 1) partículas inorgánicas incrustadas en un polímero inorgánico; 2) incorporación de las partículas mediante uniones a la matriz principal; 3) redes interconectadas mediante uniones químicas; 4) polímeros híbridos orgánico-inorgánico.

Se han descrito diferentes métodos de modificación de la superficie de las nanopartículas de HA para garantizar una distribución más equitativa de las mismas sobre la matriz de colágeno, y para evitar la disociación de ambos componentes, mejorando la adhesión física de los mismos. Las sustancias empleadas para esta modificación deben cumplir varios requisitos: ausencia de toxicidad, biocompatibilidad y no alterar las características físico-químicas del colágeno y la HA. Entre los productos utilizados se encuentran el ácido hexanoico y el ácido decanoico, el ácido carboxílico, el ácido estárico, el dodecilsulfato sódico (SDS) o el ácido pirofosfórico⁽²³²⁾.

4.3.4.- Resultados experimentales de sustitutos óseos de colágeno-HA.

En los últimos años se han utilizado compuestos de colágeno-HA presentando diferentes resultados en estudios *in vitro* (usando células osteogénicas) e *in vivo* (en defectos óseos generados en modelos animales). En la Tabla 22 se presentan los resultados de diferentes trabajos con modelos experimentales con animales. La tabla refleja el potencial para la formación rápida de tejido óseo de superficie en menos de 3 semanas. Es esperable que los materiales inertes no presenten este comportamiento.

Compuesto	Método de fabricación	Cutivo celular o implantación	Tiempo hasta aparición de tejido neoformado
CO ₃ Apatita-Colágeno (Okazaki ⁽¹⁸⁶⁾)	Mezcla directa, centrifugado, secado al aire. Baja porosidad.	Implantación en el periostio craneal de ratas	21 días (hueso mineralizado).
PCCA-TCP-Colágeno (Du ⁽⁶⁴⁾)	Mineralización in vitro del colágeno. Sustituto poroso en láminas	Implantación en músculo del muslo de ratas.	7 días (tejido conectivo y neovascularización).
HA-Colágeno (Kikuchi ⁽¹³³⁾)	Mineralización in vitro. Cilindros densos con túneles.	Implantación en tibia de perros beagle.	54 días (hueso mineralizado).
HA-Colágeno (Itoh ⁽¹¹⁸⁾)	Mineralización in vitro. Compuesto denso.	Implantación en columna cervical de perros beagle.	13 semanas (inicio de callo óseo).
FGMgCO ₃ Ap-Colágeno (Yamasaki ⁽²⁸³⁾)	Mezclado directo, secado al aire.	Implantación en cráneo de ratas y fémur de conejos.	14-28 días (hueso mineralizado).
HA-Colágeno-Alginato (Sotome ⁽²²⁶⁾)	Mineralización in vitro. Liofilización.	Implantación en fémur de ratas.	14 días (hueso mineralizado).
nHA-Colágeno (Martins ⁽¹⁵⁹⁾)	Mineralización in vitro. Compuesto pastoso.	Implantación en hueso infraorbitario de ratas.	60 días (hueso mineralizado).
CAP-Colágeno (Suh ⁽²³⁰⁾)	Mezcla directa, liofilización. Alta porosidad	Implantación en radio de conejos.	28 días (hueso mineralizado).

Tabla 22: Comparación de experimentos *in vivo* con diferentes compuestos colágeno-HA. PCCA-TCP: carbonato-apatita con pobre cristalinidad-fosfato tetra-cálcico (*poorly crystalline carbonate-apatite-tetracalcium phosphate*); FGMgCO₃Ap: cristales de CO₃ apatita graduados funcionalmente con Magnesio (*functionally graded CO₃ apatite crystals containing magnesium*); CAP: carbonato-apatita.

II.- OBJETIVOS

La búsqueda de un sustituto óseo que reúna las características biológicas y mecánicas ideales continúa siendo un reto en la ingeniería tisular ósea. El colágeno es una proteína que se encuentra distribuida por todo el organismo y que ha demostrado su biocompatibilidad y biodegradación cuando ha sido utilizada como sustituto óseo. La HA nanométrica es uno de los principales componentes del tejido óseo natural y se ha demostrado que favorece el proceso de regeneración ósea. El empleo de compuestos a base de colágeno e HA, utilizando diferentes métodos de fabricación, ha sido estudiado con anterioridad.

Por otro lado, la glicoproteína SPARC (*Secreted Protein Acidic and Rich in Cysteine*) u osteonectina desempeña un importante papel en diferentes procesos del metabolismo del hueso, como la morfogénesis ósea, y la migración y proliferación celular durante el remodelado óseo, y presenta una alta afinidad de unión con el colágeno tipo I, calcio e hidroxapatita.

La **hipótesis de trabajo** de este estudio se basa en que la implantación de un nuevo sustituto biológico compuesto de colágeno I/III, hidroxapatita nanométrica y proteína SPARC aplicado sobre un defecto óseo de tamaño crítico, generado artificialmente en un modelo experimental en ratas Wistar es capaz de facilitar la regeneración ósea.

Los objetivos de este trabajo son los siguientes:

1.- Desarrollar un modelo experimental en animales de laboratorio de pequeño tamaño (ratas Wistar) para implantar el compuesto de colágeno, nanoHA y proteína SPARC y comparar los resultados con tres grupos control:

- Grupo 2: generación de defecto óseo sin aporte de ningún sustituto.
- Grupo 3: defecto óseo relleno de colágeno.
- Grupo 4: relleno del defecto óseo con hidroxapatita comercial Engipore®.

2.- Realizar una evaluación clínica y mediante estudios histológicos de las diferencias cualitativas del tejido óseo neoformado en la zona del defecto crítico en el grupo de estudio y en los diferentes grupos control.

3.- Valorar la biocompatibilidad, actividad biológica y capacidad osteoinductora del compuesto objeto de estudio mediante su aplicación subcutánea.

4.- Conocer las características morfológicas del compuesto y sus componentes y comprender las modificaciones inducidas por las técnicas histológicas en los materiales, realizando un estudio del mismo sin implantación previa.

III.- MATERIAL Y METODOLOGÍA

Para el desarrollo de nuestro trabajo diseñamos un estudio experimental con ratas Wistar para determinar el efecto de la aplicación de un biocompuesto de colágeno tipo I/III, proteína SPARC y nanopartículas de hidroxiapatita sobre un defecto óseo generado artificialmente.

El proyecto fue aprobado por el Comité Ético de Experimentación Animal del Hospital Universitario Puerta de Hierro-Majadahonda (HUPHM), perteneciente al Servicio de Salud de la Comunidad de Madrid.

El trabajo presentado en esta memoria resulta de la colaboración con un proyecto internacional del Ministerio de Asuntos Exteriores, coordinado en Portugal por la Dra. Alis Yovana Pataquiva y el Dr. Fernando Jorge Monteiro, del Laboratorio de Materiales del Instituto de Engenharia Biomedica de Oporto, y en España por el Dr. Pablo de la Cuadra Virgili y el Dr. Eduardo Jorge Herrero, del HUPHM.

1.- OBTENCIÓN Y PREPARACIÓN DEL BIOCOMPUESTO Y RESTO DE SUSTITUTOS IMPLANTADOS

El biocompuesto empleado en el estudio fue proporcionado por los Dres. Alis Yovana Pataquiva y Fernando Jorge Monteiro, del Laboratorio de Materiales del Instituto de Engenharia Biomedica de Oporto. Dicho compuesto se obtiene siguiendo el protocolo expuesto a continuación⁽¹⁶¹⁾.

En primer lugar se realiza la preparación de las nanopartículas de hidroxiapatita mediante un método de precipitación química húmeda, partiendo de una solución acuosa de hidróxido de calcio ($\text{Ca}(\text{OH})_2$) y ácido ortofosfórico (H_3PO_4 , 85%) como reactantes de fase aguda. Para ello, se añade lentamente, gota a gota, un litro de una suspensión acuosa de H_3PO_4 0,6M a un litro de otra suspensión de $\text{Ca}(\text{OH})_2$ 1M, previamente mezclada a su vez con dodecilsulfato sódico (SDS), mientras se remueve enérgicamente durante un plazo de 2 horas. El SDS es un surfactante iónico que impide la aglomeración de las partículas de nanoHA. Se añade a continuación hidróxido de sodio ($\text{Na}(\text{OH})$) concentrado hasta conseguir un pH final de 10,5. La solución blanquecina obtenida se lava usando agua desionizada, y se seca en un horno a 80°C

durante 24 horas. Con este método se obtienen partículas de HA con forma de aguja con un tamaño menor de 100 nm⁽¹⁶¹⁾.

El siguiente paso en el procesamiento de las esponjas de nanoHA/colágeno parte de una suspensión ácida de colágeno acuoso tipos I/III de origen porcino (Getslich Biomaterials, Wouhusen, Switzerland) que se mezcla homogéneamente a 4°C durante 90 minutos con el polvo de nanoHA (nanohidroxiapatita) obtenida en el paso previo. Durante esta fase se emplea un sistema de refrigeración para mantener la temperatura de la suspensión constante a 4°C todo el tiempo de mezclado para de este modo evitar la desnaturalización de las fibras de colágeno. La mezcla de microesferas de nanoHA con colágeno tipos I/III es entonces desgasificada al vacío (50 mTorr) durante 60 minutos para retirar las burbujas creadas durante su mezclado. A continuación, el biocompuesto se prepara para su liofilización, sometiéndose para ello a una temperatura progresivamente decreciente desde 20°C hasta -40°C durante un tiempo de 60 minutos. Posteriormente, se mantiene a temperatura constante a -40°C durante 120 minutos y a continuación se somete a un proceso de sublimación a 100-200 mTorr y 0°C durante 17 horas^(182, 194).

El endurecimiento de los andamios o esponjas de colágeno I/III con nanohidroxiapatita se consigue mediante un proceso físico de entrecruzamiento de sus fibras denominado tratamiento deshidrotérmico. Este proceso se realiza en un horno de vacío a 50 mTorr. El vacío se mantiene a 105°C durante 24 horas para inducir la formación de enlaces covalentes entre las cadenas polipeptídicas de las fibras de colágeno^(182, 286). Los andamios formados se impregnan a continuación con 20 µl de proteína SPARC (Sigma, St Louis, MO) para una concentración final de 4 µg de proteína/ml en tampón fosfato salino. Las soluciones de Ca(OH)₂ (Riedel-de-Haden, Hannover, Alemania) y H₃PO₄ (Riedel-de-Haden, Hannover, Alemania) en concentraciones de 66,36 mM y 39,74 mM (ratio Ca/P 1,67) respectivamente son mezcladas en una proporción 1:1 inmediatamente antes de su utilización⁽⁷⁹⁾; a continuación se distribuye a cada lado del andamio 20 ml de la mezcla formada empleando para ello una pipeta, y se deja reposar durante 20 minutos. A continuación se añaden a cada lado del andamio 20 µl de nanopartículas de hidroxiapatita en suspensión (1:5 p/p) y se deja reposar otros 20 minutos. Para conseguir un mayor entrecruzamiento, las matrices se sumergen durante una hora en una solución que contiene 1-etil-3-(3-

dimetilaminopropil) carbodiimida (EDAC, Sigma, St Louis, MO) y N-hidroxisuccinimida (NHS, Sigma, St Louis MO) en una proporción de EDAC:NHS de (10:4)⁽²⁵⁹⁾. Las concentraciones de EDAC y NHS se establecen en base a una masa media de los andamios de 0.002 g.

Después del proceso de liofilización, las muestras son preparadas para su implantación en forma de discos de 1 cm de perímetro para su empleo subcutáneo, o bien en cilindros de 1 mm de diámetro por 5 mm de longitud para ser empleados a nivel intraóseo. Las muestras fueron esterilizadas hasta su implantación empleando óxido de etileno, y fueron remitidas al HUPHM.

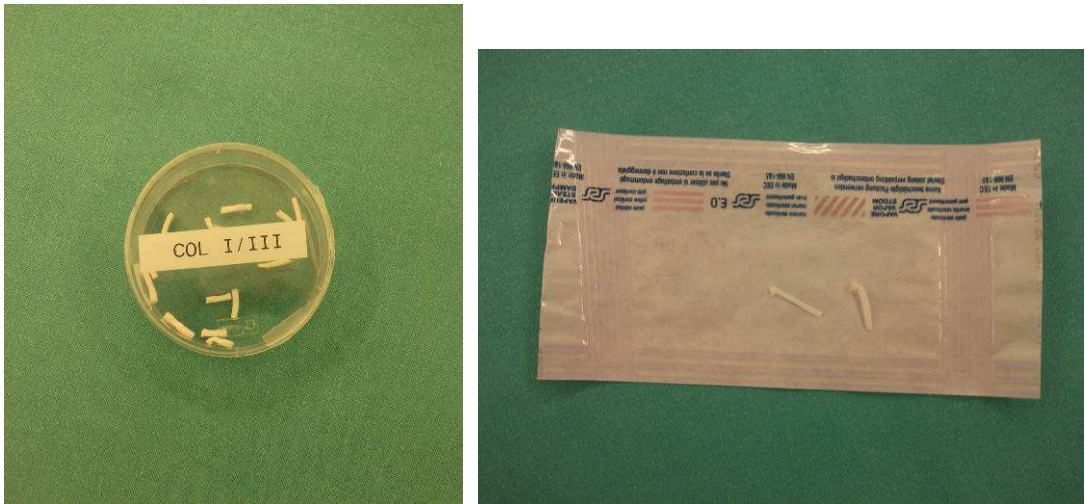


Figura 17: Muestras en forma de cilindro para su implantación intraósea;
 Figura 18: Muestras esterilizadas previas a su implantación.

Para la obtención de las muestras de colágeno I/III aslado, sin aporte de nanoHA, se siguió el mismo proceso descrito anteriormente hasta el punto de mezclado con la cerámica.

Características compuesto estudio	
Síntesis nanoHA	Precipitación química húmeda
	Surfactante SDS
	Tamaño nanoHA: 80 x 20 nm
Entrecruzamiento del polímero	Físico: deshidrotérmico
	Químico: EDAC:NHS, (10:4)
Características estructurales	Tamaño del poro 208 ± 65 μm
	Porosidad 89%

Tabla 23: Características del compuesto de colágeno I/III, nanoHA y SPARC de este estudio.

El análisis morfométrico de la estructura así formada ha demostrado un tamaño de poro de $208 \pm 65 \mu\text{m}$ y una porosidad del $89 \pm 3,9\%$ ⁽¹⁶¹⁾. De esta manera se ha conseguido fabricar andamios con un tamaño de poro uniforme, y que corresponde con los cristales de hielo que ocupaban el espacio de los poros durante el proceso de congelación^(182, 194).

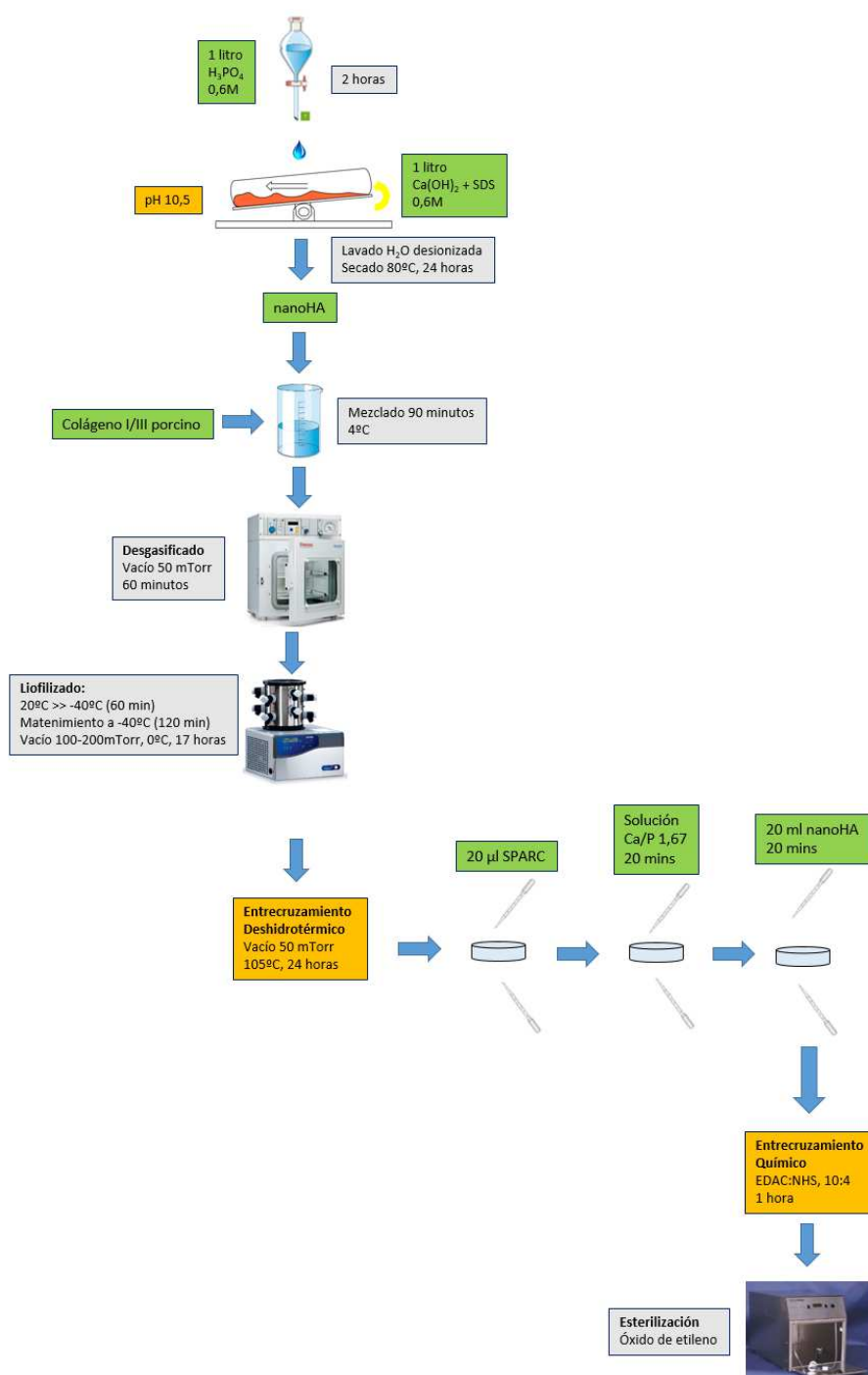


Figura 19: Representación esquemática de la síntesis del compuesto de colágeno I/III, nanoHA y SPARC de este estudio.



Figura 20: Andamios de colágeno tipo I/III obtenidos mediante la técnica descrita por el equipo de Oporto⁽¹⁶¹⁾.

En cuanto a la hidroxiapatita comercial utilizada (Engipore®, Fin-Ceramica, Feanza, Italia), se utilizó el excedente de un producto utilizado para una intervención quirúrgica. Se trata de un sustituto cerámico disponible en el mercado en la actualidad, con una arquitectura muy similar al tejido óseo natural, y con un tamaño de poro entre 200 y 500 μm , y una porosidad de un 90%, lo que facilita la osificación. Este material, utilizado en forma de chips de 1-2,5 mm, fue esterilizado y tallado previamente a su utilización en nuestro estudio.



Figura 21: Hidroxiapatita comercial (Engipore®)

2.- ESTRUCTURA DE TRABAJO

El experimento fue realizado en dos fases, interviniéndose en total 43 ratas Wistar de 8 semanas de vida. El objetivo principal de la primera fase fue valorar la capacidad osteoinductora del compuesto objeto del estudio, según los parámetros de Urist^(252, 253). Las primeras muestras subcutáneas e implantes intraóseos fueron realizados a lo largo del año 2009. Se realizaron implantes subcutáneos en 14 animales, e implantes intraóseos en 3 animales.

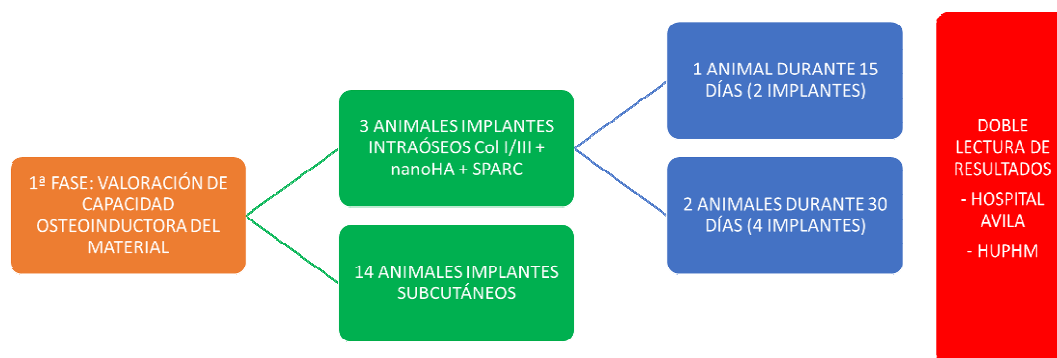


Figura 22: Esquema de la primera fase del estudio

Los 26 animales restantes fueron intervenidos entre diciembre de 2011 y abril de 2012 para completar el número de animales que se estimó necesario, según se describe en el siguiente esquema:

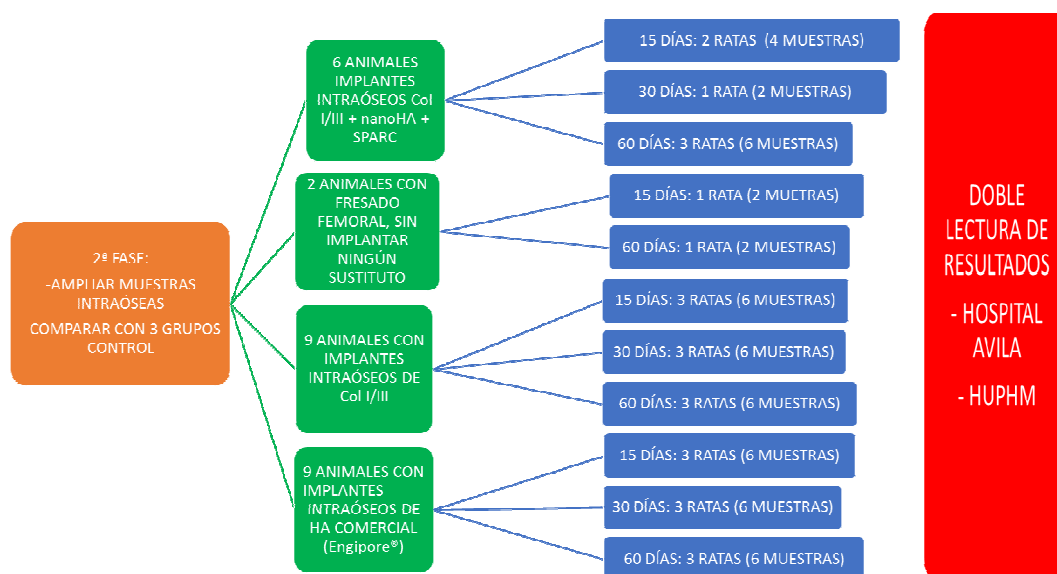


Figura 23: Esquema de la segunda fase del estudio

Los 29 animales que recibieron implantes intraóseos fueron aleatorizados según orden correlativo en 4 grupos diferentes, con distintos tiempos de seguimiento: 15, 30 y 60 días (tablas 24 y 25).

- Grupo 1: implantación de biocompuesto de colágeno I/III, hidroxiapatita nanométrica y proteína SPARC (9 animales, 18 muestras intraóseas).

- Grupo 2: generación de defecto óseo sin aporte de ningún sustituto (2 animales, 4 muestras intraóseas).
- Grupo 3: defecto óseo relleno de colágeno I/III (9 animales, 18 muestras intraóseas).
- Grupo 4: relleno de defecto óseo con hidroxiapatita comercial Engipore® (9 animales, 18 muestras intraóseas).

	15 días	30 días	60 días
Grupo 1: Col I/III + nHA + SPARC	3 ratas (6 muestras)	3 ratas (6 muestras)	3 ratas (6 muestras)
Grupo 2: sólo fresado del fémur	1 rata (2 muestras)		1 rata (2 muestras)
Grupo 3: Col I/III	3 ratas (6 muestras)	3 ratas (6 muestras)	3 ratas (6 muestras)
Grupo 4: HA comercial (Engipore)	3 ratas (6 muestras)	3 ratas (6 muestras)	3 ratas (6 muestras)

Tabla 24: Tabla resumen del número de animales y de muestras distribuidas por grupos y por tiempos de duración de implantación.

	15 días			30 días			60 días		
GRUPO 1 Col I/III +nHA+ SPARC	105 (29/6/09) Ret 14/7/09	131 (2/3/12) Ret 16/3/12	132 (2/3/12) Ret 16/3/12	103 (22/6/09) Ret 21/6/09	104 (22/6/09) Ret 21/6/09	127 (21/2/12) Ret 20/3/12	109 23/12/11 Ret 20/2/12	118 (30/1/12) Ret 30/3/12	119 (30/1/12) Ret 30/3/12
GRUPO 2 Fresado del fémur, sin implante	112 (20/1/12) Ret 6/2/12						107 23/12/11 Ret 20/2/12		
GRUPO 3 Col I/III	125 (13/2/12) Ret 27/2/12	129 (2/3/12) Ret 16/3/12	130 (2/3/12) Ret 16/3/12	111 23/12/11 Ret 23/1/12	113 (20/1/12) Ret 20/2/12	126 (21/2/12) Ret 20/3/12	108 23/12/11 Ret 20/2/12	116 (30/1/12) Ret 30/3/12	117 (30/1/12) Ret 30/3/12
GRUPO 4 HA comercial (Engipore)	122 (13/2/12) Ret 27/2/12	123 (13/2/12) Ret 27/2/12	124 (13/2/12) Ret 27/2/12	114 (20/1/12) Ret 20/2/12	115 (20/1/12) Ret 20/2/12	128 (21/2/12) Ret 20/3/12	110 23/12/11 Ret 20/2/12	120 (13/2/12) Ret 13/4/12	121 (13/2/12) Ret 13/4/12

Tabla 25: Animales distribuidos por grupos y tiempos, con su fecha de implantación y de retirada (Ret).
Implantes intraóseos.

El procesamiento de todas las muestras histológicas fue realizado por el Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Provincial de Ávila (HPA). El estudio y diagnóstico de las preparaciones histológicas obtenidas fue realizado mediante una doble observación por los servicios de Anatomía Patológica del HPA y el HUPHM. El análisis de las muestras por parte de los patólogos fue ciego en cuanto a la duración de la implantación y el material empleado en cada caso.

3.- MODELO EXPERIMENTAL

Los pasos seguidos en la técnica quirúrgica fueron los siguientes:

3.1.- LOCALIZACIÓN

Las intervenciones quirúrgicas de la primera fase fueron realizadas en los quirófanos de Cirugía Experimental de la antigua Clínica Puerta de Hierro de Madrid. La segunda fase del estudio se desarrolló en las nuevas instalaciones de Cirugía Experimental del Hospital Universitario Puerta de Hierro-Majadahonda de Madrid. Todas las intervenciones fueron realizadas por el mismo cirujano, empleando la misma técnica quirúrgica.



Figura 24: Quirófano de Cirugía Experimental del Hospital Puerta de Hierro-Majadahonda donde se desarrollaron las intervenciones

3.2.- MANTENIMIENTO Y CUIDADOS PREOPERATORIOS

Los animales fueron obtenidos a partir de la colonia que dispone el centro, auspiciado por la Instituto de Investigación Puerta de Hierro. En todos los casos fueron ratas Wistar de 8 semanas de vida, con un peso de entre 250-350 gramos en el momento de la intervención.



Figura 25: Rata Wistar de 8 semanas de vida.

Los animales, emplazados en microaisladores U-TEMP de 18 cm de altura transparentes de suelo sólido y con virutas como lecho emplazados en rack ventilados asegurando una presión positiva interna, fueron mantenidos en ciclos de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad, 20-24°C de temperatura y 50-60% de humedad relativa. Los animales fueron estabulados en grupos asegurando siempre la disponibilidad de espacio según RD 53/2013⁽¹⁾. En todas las jaulas se añadió material de enriquecimiento ambiental, concretamente material para hacer nido. Los cambios de lecho, alimentación y bebida así como los procedimientos fueron llevados a cabo por personal debidamente entrenado y acreditado.



Figura 26: Animalario de Cirugía Experimental del Hospital Universitario Puerta de Hierro.

3.3.- ANESTESIA Y PREPARACIÓN PREQUIRÚRGICA

Las ratas, sin premedicar, fueron colocadas en una cámara de inducción de metacrilato a la cual se administró sevoflurano al 8% vaporizado en un flujo continuo de 3 L/min de oxígeno. La anestesia se mantuvo con sevoflurano (2.5-3%) vaporizado en un flujo de 1 L/min administrado mediante un circuito en T-Ayre adaptado para roedores. La analgesia intraoperatoria se mantuvo mediante la administración subcutánea de cloruro mórfico (1 mg/kg). Se controló la temperatura rectal y se mantuvo entre 37 y 38 °C mediante un sistema de calentamiento por aire.

No se realizó profilaxis antibiótica, ya que no se objetivaron signos de infección en los animales que se intervinieron durante la fase de prueba inicial.



Figura 27: a) Cámara para la inducción anestésica; b) Mantenimiento anestésico con mascarilla y bomba de calor constante; c) Morfina subcutánea prequirúrgica.

3.4.- TÉCNICA QUIRÚRGICA

Los animales eran colocados en decúbito supino sobre la mesa quirúrgica una vez que se encontraban correctamente anestesiados y tras administrar la analgesia con morfina. A continuación se preparaba el campo quirúrgico, realizando un rasurado cuidadoso de la zona a intervenir, en este caso la articulación de la rodilla, y posterior desinfección con solución yodada diluida al 50%.

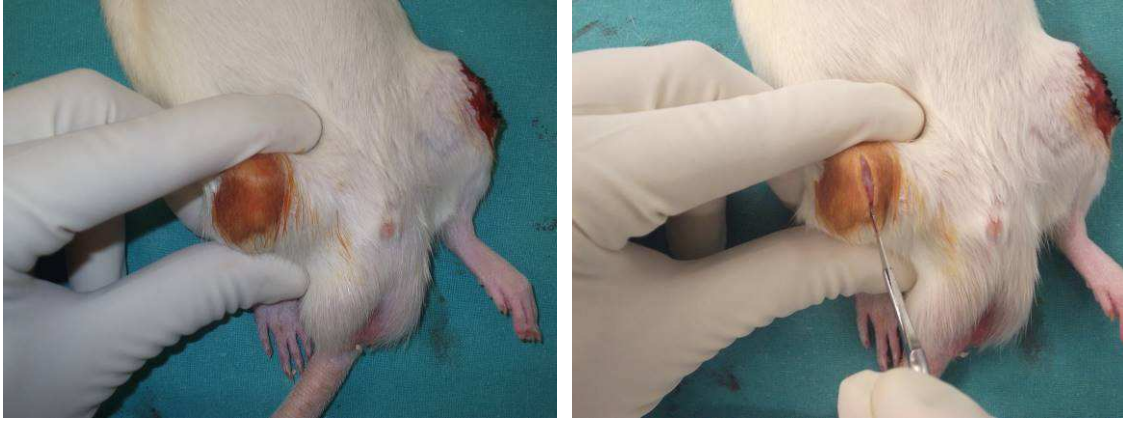


Figura 28: a) Preparación del campo quirúrgico con solución yodada, tras rasurado de piel; b) Incisión cutánea.

En todos los casos el abordaje quirúrgico consistió en una incisión cutánea central en la rodilla, y una artrotomía pararrotuliana interna. Se precedió posteriormente a la luxación lateral de la rótula, manteniendo esta posición mediante flexión forzada de la extremidad. A continuación, se realizó el fresado del canal femoral distal empleando para ello agujas tipo Abbocath® de tamaño creciente sucesivo, de calibre 18, 16 y 14Ga, generando así un defecto de 1.5 mm de diámetro.



Figura 29: a) Luxación lateral de rótula tras abordaje pararrotuliano interno; b) Fresado progresivo con agujas tipo Abbocath.

Una vez preparado el lecho receptor, y tras lavado con suero abundante, se procedió a la implantación de la muestra elegida en cada caso, o a la no implantación en los dos animales que fueron utilizados en el grupo 2: sólo defecto óseo.



Figura 30: a) Defecto óseo femoral distal preparado para la implantación; b) Cilindro de biocompuesto en el momento de su implantación en el lecho receptor.

Posteriormente se realizó al cierre por planos, empleando una sutura absorbible multifilamento tipo Vicryl® 3/0 para el cierre de la artrotomía, y una seda de 2/0 para el cierre cutáneo. Antes de terminar el proceso se realizó una nueva desinfección con solución yodada.



Figura 31: a) Cierre de artrotomía; b) Cierre de piel

Por último se procedió a retirar la mascarilla de anestesia y esperar al despertar espontáneo del animal.

3.5.- CUIDADOS POSTOPERATORIOS

Después de la cirugía, los animales fueron colocados independientemente en microaisladores U-TEMP. La analgesia postoperatoria se aseguró con la administración de cloruro mórfico subcutáneo durante los 2 días posteriores a la cirugía.

Los animales permanecieron en sus jaulas, donde deambulaban libremente y disponían de comida y agua *ad libitum* desde el postoperatorio inmediato hasta la fecha de la eutanasia correspondiente y posterior retirada de los implantes, siendo evaluados y controlados a diario por el personal del animalario.

3.6.- EUTANASIA DE LOS ANIMALES

Antes de la eutanasia, los animales fueron anestesiados mediante la administración intraperitoneal de ketamina (100 mg/kg) + diacepam (25 mg/kg). A continuación, y tras la canalización de la vena caudal de la cola con un catéter de polietileno de 24G, se administró cloruro potásico hasta certificar el paro cardíaco del animal.

Los tiempos de sacrificio de los animales se estimaron en 15, 30 y 60 días.

Una vez sacrificado el animal, empleando nuevamente un abordaje pararrotuliano interno con extensión proximal, y tras desarticular la rodilla y la cadera, se extrajo en una pieza el fémur completo. Tras limpiarlo y desbridarlo de partes blandas, se introdujo en formalehído al 4% para su conservación y las muestras se enviaron a continuación al Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Provincial de Ávila para su procesamiento y estudio histológico.

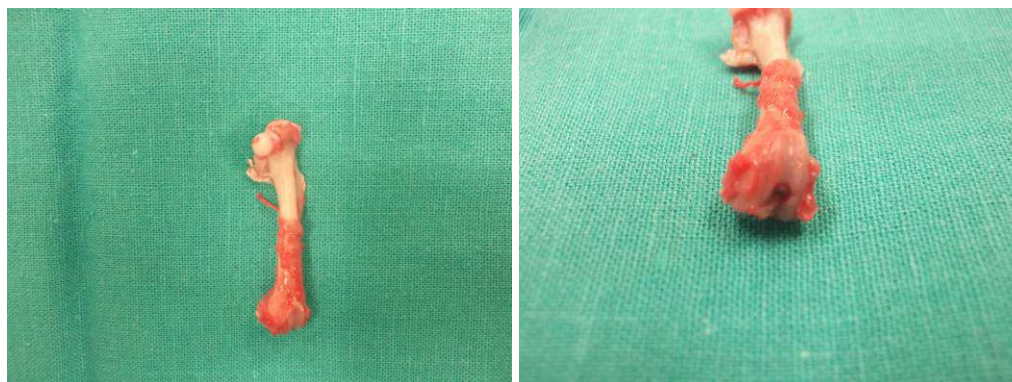


Figura 32: a) Fémur completo de rata tras su extracción; b) Detalle de lugar de implantación de muestra intraósea a nivel del fémur distal.

4.- ESTUDIOS REALIZADOS

Siguiendo la hipótesis de trabajo del estudio se comparó si existen diferencias histológicas en cuanto a regeneración ósea entre el grupo de estudio, en el que se implantó el biocompuesto de colágeno I/III, nanopartículas de hidroxiapatita y proteína SPARC, y los tres grupos control. Para ello se analizaron las muestras obtenidas con diferentes técnicas histoquímicas.

4.1.- ESTUDIO HISTOLÓGICO

La preparación de todas las muestras se llevó a cabo por el Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Provincial de Ávila. Las piezas se tallaron en sentido longitudinal y transversal, se fijaron de nuevo en formol neutro al 10% y se incluyeron en parafina, utilizando un procesador de tejidos automático.

Las piezas óseas se descalcificaron previamente sumergiéndolas en un decalcificador comercial de uso rutinario (Surgipath®: Ácido clorhídrico, EDTA y agua) siguiendo el protocolo aconsejado por el fabricante.

Se realizaron cortes de 3-3,5 μm con un microtomo de rotación semiautomático NIKON® Eclipse E600.

Tanto los cortes subcutáneos como los cortes óseos se tiñeron siguiendo protocolos de rutina con Hematoxilina-Eosina (HE), que permite diferenciar los núcleos del citoplasma.

Se estableció un panel de tinciones especiales para las muestras óseas que se realizaron también de forma simultánea con preparados comerciales de uso rutinario en los laboratorios (Bio-Óptica®), con el fin de garantizar la uniformidad de los resultados. Estas técnicas especiales fueron:

- Tricrómico de Masson⁽⁹²⁾ para la evaluación histológica e histomorfométrica. Con esta técnica podemos apreciar los núcleos celulares en color negro; los

citoplasmas, fibras musculares y gránulos acidófilos en color rojo; el colágeno y los gránulos basófilos en color verde; y los eritrocitos en color amarillo. Con esta técnica se tiñe de un color rosa anaranjado el tejido osteoide (tejido joven no calcificado) y en un color verde el hueso maduro (Figura 33).

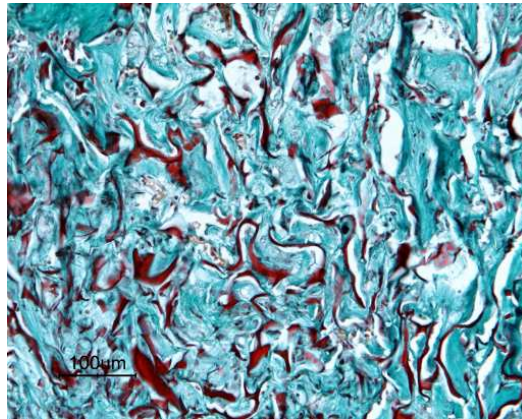


Figura 33: Implantación de colágeno I/III + nanoHA a los 30 días, donde se aprecia la maduración progresiva del tejido neoformado. Tinción de tricrómico de Masson. Foto realizada por el servicio de Anatomía Patológica del HPA.

- Impregnación argéntica de Reticulina (RET) para detectar colágeno y fibras de reticulina⁽²⁵⁴⁾. Con esta técnica podemos ver las fibras reticulares de color negro; el tejido conectivo de color marrón; y el colágeno de color dorado (Figura 34).

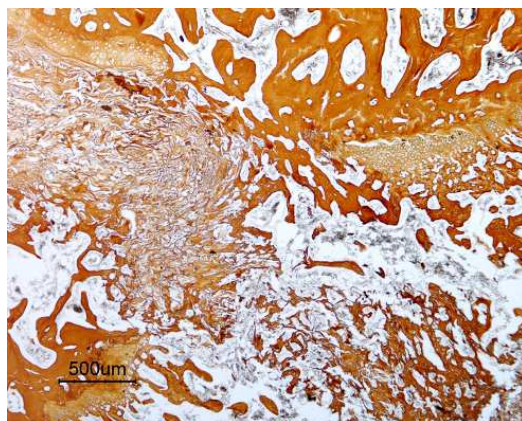


Figura 34: Implantación de colágeno I/III + nanoHA a los 30 días. Tinción por impregnación argéntica de reticulina (RET). Foto realizada por el servicio de Anatomía Patológica del HPA.

- Ácido peryódico de Schiff (PAS) la detección de hidratos de carbono y sustancias relacionadas con ellos (polisacáridos, mucopolisacáridos, glucoproteínas, glucolípidos...). Con esta técnica se tiñen las fibras de

colágeno de color rosado intenso al estar rodeadas por mucopolisáridos, los núcleos se tiñen de azul oscuro y los citoplasmas rosa claro (Figura 35).

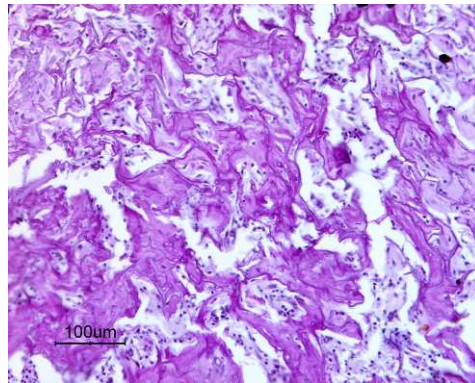


Figura 35: Implantación de colágeno I/III + nanoHA a los 30 días. Tinción con ácido peryódico de Schiff (PAS). Foto realizada por el servicio de Anatomía Patológica del HPA.

- Técnica de Von Kossa para la detección de Calcio. Es una técnica de plata que tiñe las sales de calcio de color negro y el resto del tejido de color rojizo (Figura 36).

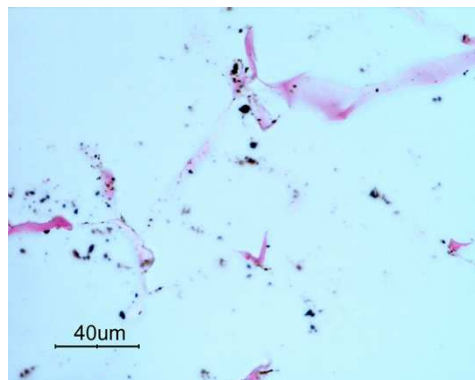


Figura 36: Colágeno I/III + nanoHA sin implantar. A la izquierda tinción de HE. A la derecha tinción con técnica de Von Kossa. Foto realizada por el servicio de Anatomía Patológica del HPA.

Como controles se analizaron tres muestras no implantadas, una de ellas de colágeno I/III, y las otras dos de colágeno I/III con SPARC y nanohidroxiapatita, antes y después de decalcificarse. Al igual que el resto de muestras, fueron fijadas en formaldehído al 4% y preparadas para su análisis microscópico.

Todas las muestras fueron procesadas por el Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Provincial de Ávila, pero la lectura e interpretación final de las muestras se realizó tanto por dicho Servicio como por el Servicio de Anatomía Patológica del HUPHM, de donde provienen la mayoría de las fotografías utilizadas. Las muestras que

llegaron hasta este Servicio presentaban artefactos secundarios a una descalcificación insuficiente, pero este hecho no ha influido en el estudio e interpretación final de las mismas.

En el Hospital Provincial de Ávila, las preparaciones se estudiaron en un microscopio óptico NIKON® ECLIPSE E600 utilizando luz blanca y polarizada dotado de una videocámara NIKON® DXM 1200. Las imágenes seleccionadas, se capturaron y revisaron con el programa de captura y análisis de imagen NIKON® ACT-1.

En el HUPHM se utilizó un microscopio LEICA® DM2000 con disposición de luz blanca y polarizada. La cámara utilizada en este caso fue una cámara digital LEICA® EC3 con alta resolución de 3,1 megapíxeles, y el programa de captura y análisis de imágenes fue LAS® EZ.

El estudio histológico cualitativo de las muestras permite diferenciar la presencia de los siguientes patrones óseos:

- Hueso compacto:** se caracteriza porque su matriz ósea mineralizada se dispone formando laminillas óseas de 3 a 7 μm de espesor, que se disponen de manera concéntrica en torno a un conducto con vasos sanguíneos y nervios denominado canal de Havers. Las células del hueso maduro son los osteocitos, que se disponen en los espacios denominados lagunas.

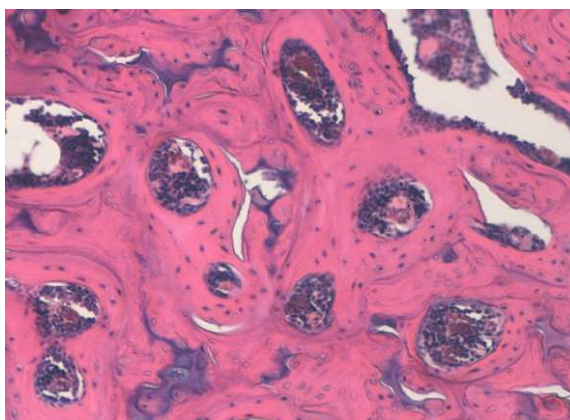


Figura 37: Hueso compacto neoformando en un defecto óseo sustituido por el biocompuesto de col I/III + nanoHA a los 15 días de su implantación, en el que pueden apreciarse los canales de Havers con la disposición de laminillas óseas a su alrededor. Tinción de HE. Foto realizada por el servicio de Anatomía Patológica del HUPHM.

•**Hueso trabecular:** dentro del cual podemos diferenciar al mismo tiempo dos posibilidades:

Tejido óseo trabecular metafisario maduro: que se caracteriza por la presencia de finos tabiques formados por superposición de laminillas óseas. Pero en este caso sus trabéculas son relativamente delgadas y normalmente no contienen vasos sanguíneos en su interior, formando un mosaico de piezas angulares de hueso laminar.

Tejido óseo trabecular neoformado: que contiene una proporción de osteocitos relativamente más alta, con unas lagunas de mayor tamaño que las que aparecen en hueso trabecular maduro y con una disposición de sus fibras de colágeno siguiendo varias direcciones.

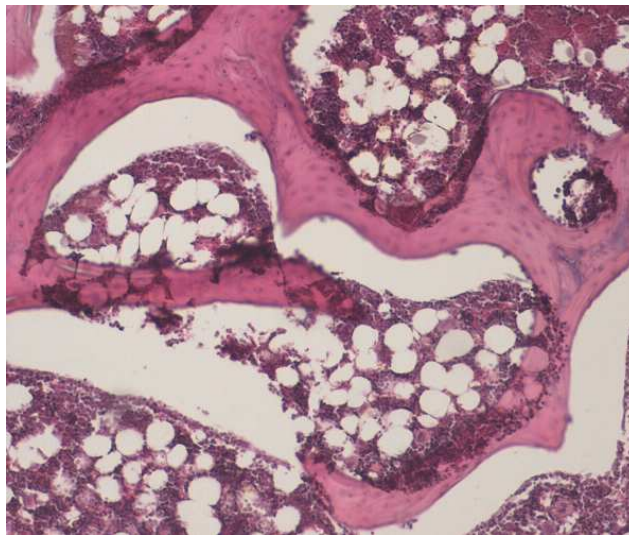


Figura 38: Hueso trabecular neoformando en un defecto óseo sustituido por el biocompuesto de col I/III + nanoHA a los 60 días de su implantación. Tinción de HE. Foto realizada por el servicio de Anatomía Patológica del HUPHM.

•**Presencia y aspecto de la HA comercial (Engipore®):** en el estudio histológico también se pudo observar la permanencia del sustituto óseo empleado en el correspondiente grupo de estudio y su reabsorción progresiva y sustitución por hueso neoformado en los diferentes tiempos de implantación, que en ningún caso fue completa.

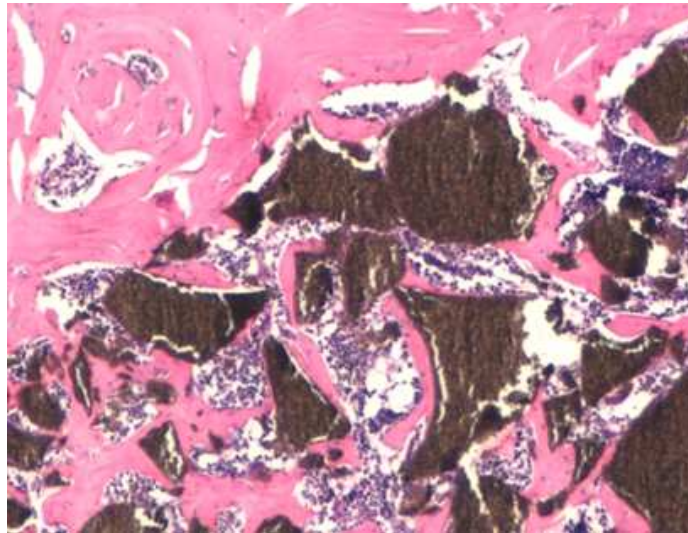


Figura 39: Aspecto de HA comercial en gránulos que aún no se ha reabsorbido con la presencia de trabéculas óseas neoformadas bordeando a los mismos a los 15 días de su implantación. Tinción de HE. Foto realizada por el servicio de Anatomía Patológica del HUPHM.

•**Respuesta del tejido óseo al biomaterial:** se analizó la persistencia del biomaterial implantado, así como la presencia de otros tejidos diferentes al tejido óseo. Se prestó especial atención a la presencia de tejido conjuntivo fibroso, que apareciese rodeando al biomaterial implantado o al canal labrado. También se buscó la presencia de signos de reacción inflamatoria como pueden ser la aparición de linfocitos o células gigantes a cuerpo extraño. Por último se valoró la presencia de eosinófilos que pudiesen significar una reacción alérgica al material implantado.

Para realizar el estudio y diagnóstico de las preparaciones histológicas, y para valorar la calidad y tipo de los patrones óseos neoformados que acabamos de enumerar, y poder comparar los resultados de los diferentes compuestos implantados, se utilizó la escala de Heiple, descrita en su artículo original de 1963^(104, 195). Con esta escala valoramos cuatro parámetros diferentes:

- el grado de madurez ósea del tejido presente en el defecto óseo generado
- la presencia y calidad de la médula ósea en dicho defecto
- la persistencia del defecto óseo o su cierre completo
- el comportamiento del tejido óseo adyacente al defecto.

Estos cuatro parámetros se valoraron según la escala que se reproduce a continuación:

Grado de madurez ósea	
0	Ausente
1	Presencia de células indiferenciadas
2	Proliferación y diferenciación de las células indiferenciadas a células formadoras de hueso
3	Presencia de islotes aislados de hueso inmaduro
4	Espículas óseas uniendo los islotes de hueso inmaduro conformando un patrón heterogéneo
5	Hueso maduro compacto
Presencia y calidad de médula ósea	
0	Ausente
1	Hematopoyéticamente activa, presencia mayoritaria de eritrocitos
2	Disminución del número de linfocitos y aumento del número de adipocitos
3	Médula ósea amarilla
Continuidad del defecto-hueso normal (unión ósea)	
0	Ausencia de formación ósea en el reborde del defecto
1	Escasa formación ósea
2	Moderada formación ósea; 1/3 del defecto óseo presenta relleno óseo
3	Elevada formación ósea; 2/3 del defecto presentan óseo relleno óseo
4	Relleno casi total del defecto (mayor de 2/3 del defecto)
5	Continuidad del defecto con el hueso normal del 100%
Formación ósea periférica	
0	Ausente
1	Escasa
2	Moderada
3	Elevada

Tabla 26: Escala de puntuación numérica asignada a cada uno de los parámetros histológicos siguiendo el modelo propuesto por Heiple ⁽¹⁰⁴⁾.

4.2.- ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

El análisis descriptivo de los cuatro grupos de estudio se realizó utilizando la mediana, percentiles 25 y 75, y valores mínimo y máximo.

Para contrastar diferencias entre los cuatro grupos a cada tiempo de implantación, se realizó la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis. En caso de encontrar diferencias estadísticamente significativas entre alguno de los cuatro grupos, se realizaron pruebas a posteriori mediante tests de Mann-Whitney, ajustando por la corrección de Bonferroni⁽²⁰³⁾.

El nivel de significación se ha fijado en 0,05 para todos los contrastes, salvo los contrastes a posteriori, en los que el nivel de significación fue de 0,008 (corrección de Bonferroni).

El paquete estadístico utilizado es Stata/IC v.14.2. (StataCorp. 2015. Stata Statistical Software: Release 14. College Station, TX: StataCorp LP.)^(36, 59)

IV.- RESULTADOS

1.- RESULTADOS CLÍNICOS

Durante el tiempo de estudio se valoró el estado general de los animales, su capacidad de movimiento y deambulaci3n, el aspecto de la herida y de la zona intervenida, la presencia de sangrado, exudado o colecciones, y la posible extrusi3n de los biomateriales. Todos los animales presentaron una capacidad de movimiento normal tras la cirugía. No se detect3n ninguna infecci3n a lo largo del periodo de seguimiento. En ninguno de los animales se observaron reacciones inflamatorias locales o sistémicas que pudieran sugerir un rechazo del huésped hacia los biomateriales intra3seos.

2.- RESULTADOS MACROSCÓPICOS

Se realiz3n un análisis visual macroscópico de todas las muestras extraídas tras el sacrificio de las ratas. En todos los casos fue posible la identificaci3n de la lesi3n producida a nivel del cartílago articular a través de la cual se implant3n el biomaterial correspondiente (figura 39) y en ning3n caso se observ3n la regeneraci3n completa de la misma.

Hay que destacar que el propósito de nuestro estudio es valorar la regeneraci3n ósea en un defecto producido de manera artificial mediante el fresado intramedular del fémur de las ratas, y que para ello realizamos un abordaje del hueso transarticular de tal modo que, aparte del citado defecto óseo, se gener3n un defecto cartilaginoso.

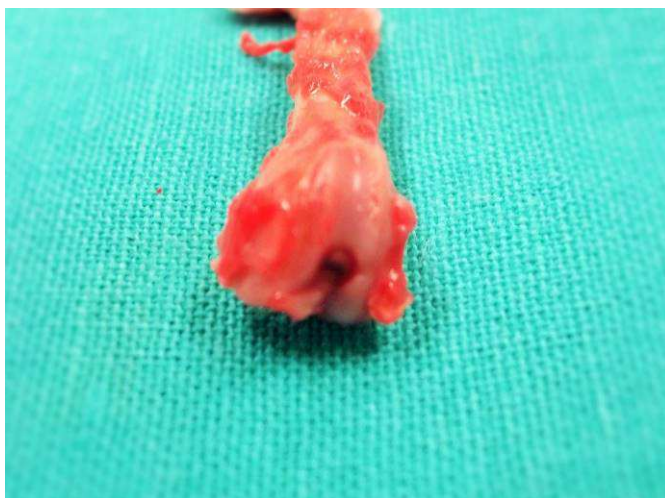


Figura 40: Defecto condral persistente en el punto de entrada del fresado intramedular a los 60 días de la implantaci3n.

3.- RESULTADOS HISTOLÓGICOS

3.1.- CONTROLES NO IMPLANTADOS

Se analizaron tres muestras no implantadas, una de ellas de colágeno I/III, y las otras dos de colágeno I/III con SPARC y nanohidroxiapatita, antes y después de descalcificarse. Estos controles no implantados fueron estudiados utilizando las mismas tinciones histológicas que posteriormente se utilizaron para las muestras implantadas.

Las mallas de colágeno I/III estaban constituidas por dos tipos de fibras: finas que se tiñen en verde con el tricrómico y gruesas que toman un color rojo. Se apreció una alteración aparente en las propiedades químicas de este colágeno (figura 41) de tal forma que las fibras finas de colágeno habían perdido su capacidad para teñirse en verde probablemente debido a la fase de procesamiento del mismo. Para intentar esclarecer el motivo de la tinción de dichas fibras en rojo en lugar del verde habitual, se realizaron tinciones sucesivas con PAS y azul de Alcian a un pH de 2,5 indicando la presencia de mucoproteínas en estas mallas de colágeno I/III.

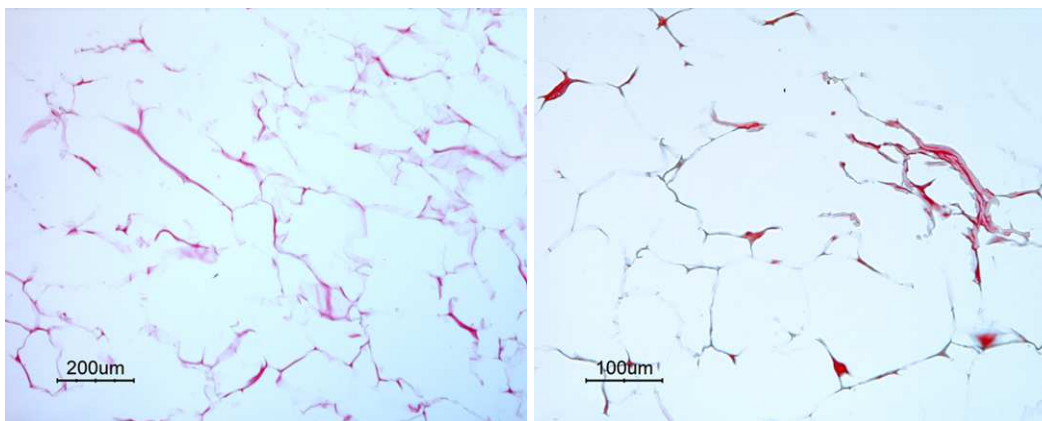


Figura 41: Colágeno I/III sin implantar. A la izquierda tinción de HE. A la derecha tinción con tricrómico de Masson (ver texto). Fotos realizadas por el servicio de Anatomía Patológica del HPA.

En los biocompuestos de control mineralizados (colágeno I/III + nanoHA) cuando se tiñen con HE se podían observar pequeños grupos de material de aspecto mineral, de tamaño variable y ligeramente basófilo, no birrefringentes, compatibles con sales de calcio (figura 42). Cuando estas muestras se teñían con técnica de Von Kossa

para la detección de calcio, pudo apreciarse la presencia de pequeños aglomerados minerales de diferentes tamaños que corresponderían a la nanoHA.

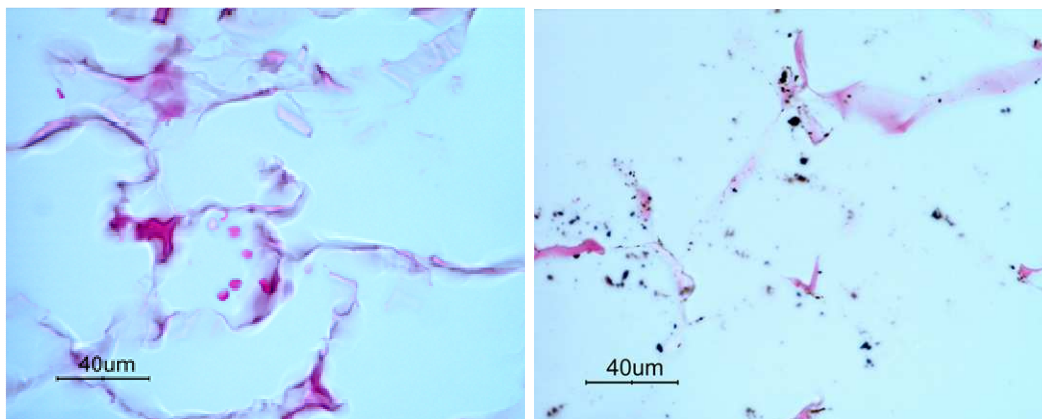


Figura 42: Colágeno I/III + nanoHA sin implantar. A la izquierda tinción de HE. A la derecha tinción con técnica de Von Kossa (ver texto). Fotos realizadas por el servicio de Anatomía Patológica del HPA.

3.2.- *IMPLANTES SUBCUTÁNEOS*

Durante la primera fase del experimento se realizó la implantación subcutánea a nivel abdominal de discos de colágeno I/III en 7 animales y de colágeno I/III con nanoHA y proteína SPARC en otros 7 animales. El objetivo buscado con la implantación subcutánea del biocompuesto objeto de nuestro estudio era doble: por una parte comprobar la biocompatibilidad y biotolerabilidad del mismo en contacto con un organismo vivo, y en segundo lugar valorar su capacidad osteoinductora, permitiendo la formación de tejido óseo *de novo* en el lugar de implantación, lejos del contacto del ambiente óseo habitual⁽²⁵²⁾.

3.2.1.- *Implantes subcutáneos de colágeno I/III*

Después de su implantación se comprobó que el biocompuesto de colágeno I/III sin nanoHA se comportaba como un cuerpo extraño, desencadenando la consiguiente reacción inflamatoria a cuerpo extraño, consistente en la infiltración del tejido por células inflamatorias y la formación de tejido de granulación⁽⁵⁷⁾. Esta reacción a cuerpo extraño se caracteriza inicialmente por la aparición de células de tipo macrófago como pueden verse en la figura 43 a los cinco días de la implantación subcutánea, y que posteriormente se fusionarán formando otras células de mayor tamaño tipo células gigantes multinucleadas a partir de la fusión de docenas de macrófagos individuales⁽⁹⁴⁾.

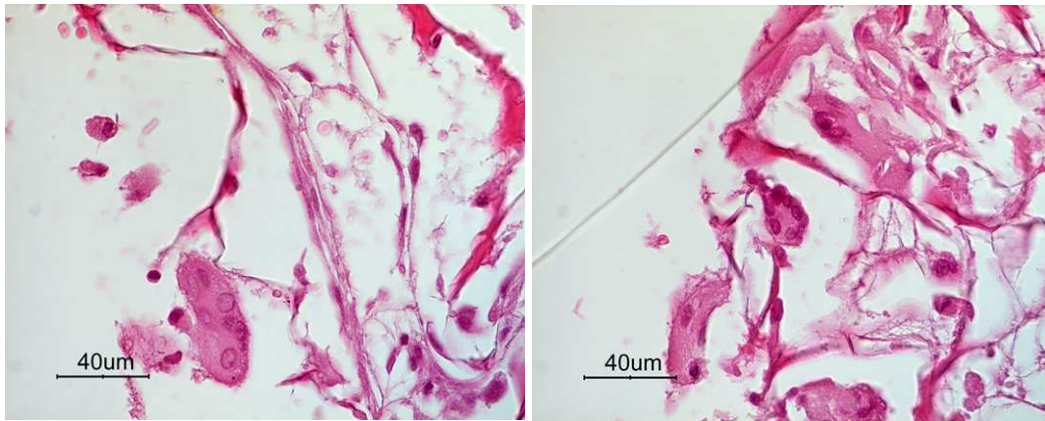


Figura 43: Formación de células gigantes a cuerpo extraño tras la implantación de colágeno I/III sin nanoHA. 5 días tras la implantación. Tinción de HE. Fotos realizadas por el servicio de Anatomía Patológica del HPA.

Según evoluciona la reacción a cuerpo extraño con el paso de los días es esperable encontrar una encapsulación del biocompuesto implantado con la aparición de una cápsula fibrosa depositada a su alrededor, aislándola del lecho receptor⁽¹³⁾. Esto puede observarse en la figura 44 con poco aumento. Si aumentamos la magnificación (figura 45), es posible observar un gran número de fibroblastos, que serán los encargados de formar el tejido de granulación, acompañados por pequeños vasos emergentes.

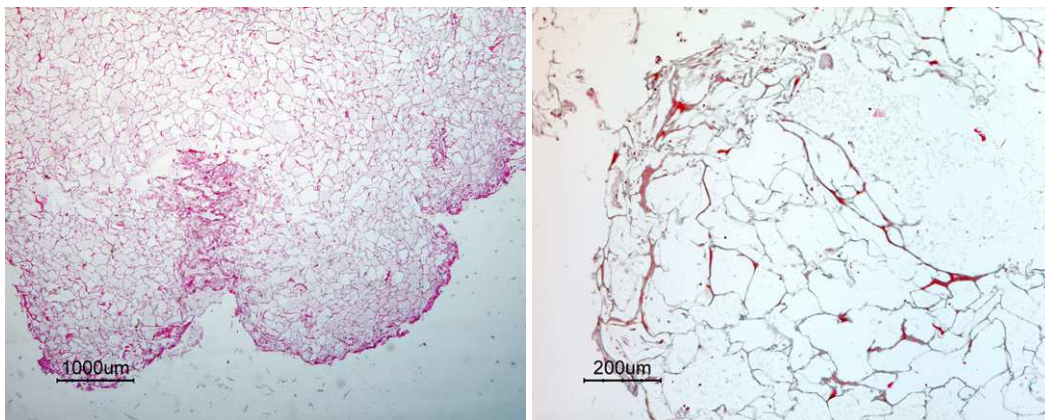


Figura 44: Implantación de colágeno I/III sin nanoHA. A poco aumento y con tinción HE se aprecia la presencia de una fina cápsula y ya se adivinan dos tipos de fibras en relación al grosor al presentar los dos colágenos I y III lo que vuelve a repetirse con el tricrómico de Masson (derecha). Fotos realizadas por el servicio de Anatomía Patológica del HPA.

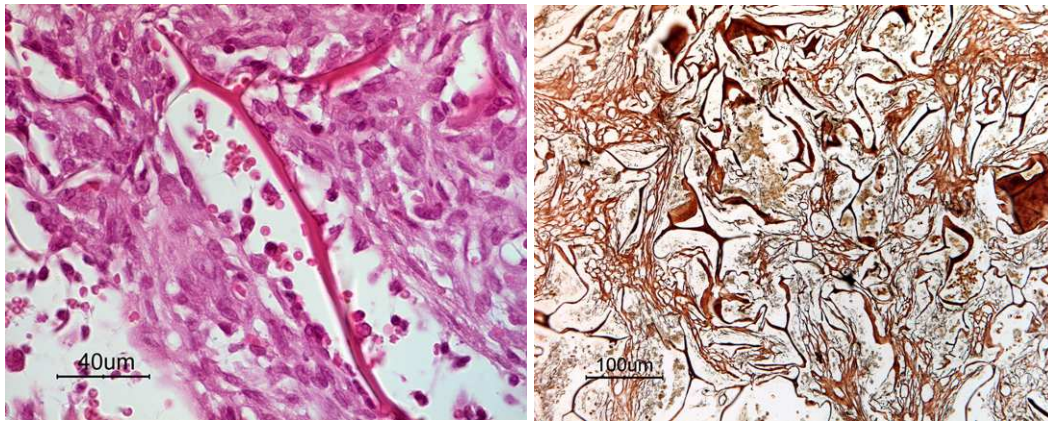


Figura 45: Izquierda: proliferación fibroblástica tras implantación subcutánea de colágeno I/III sin nanoHA a los siete días. Tinción de HE. Derecha: proliferación de fibras de colágeno y reticulina tras implantación subcutánea de colágeno I/III sin nanoHA a los siete días. Tinción con impregnación argéntica de Reticulina (RET). Fotos realizadas por el servicio de Anatomía Patológica del HPA.

3.2.2.- Implantes subcutáneos del biocompuesto colágeno I/III, nanoHA y proteína SPARC

En los casos en los que se implantó el compuesto de colágeno I/III con nanoHA y proteína SPARC, a los cinco días de la implantación pudo observarse una reacción a cuerpo extraño similar a la explicada previamente. En esta ocasión, los macrófagos fagocitaron los pequeños agregados de nanoHA que se encontraban dispersos en la malla de colágeno como puede verse en la figura 46.

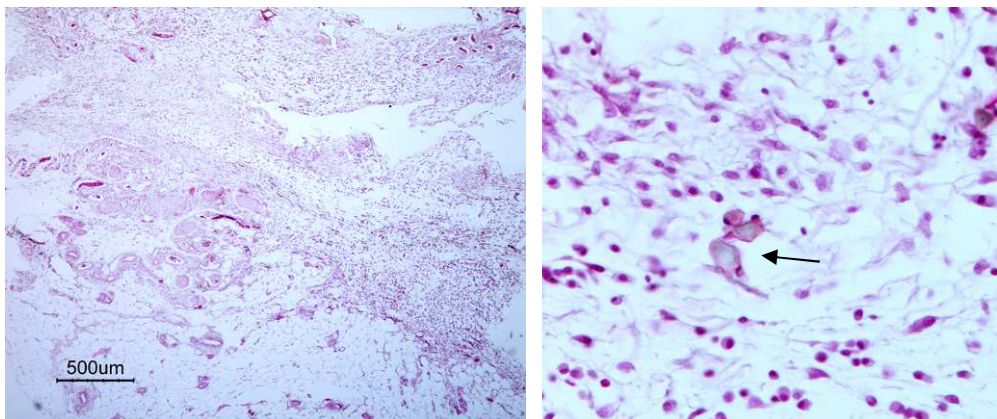


Figura 46: Reacción inflamatoria perimplante en una muestra de colágeno I/III con nanoHA a los cinco días de su implantación. A la derecha fagocitosis (flecha). Tinción con HE. Fotos realizadas por el servicio de Anatomía Patológica del HPA.

En los estadios finales, a los 15 días de la implantación, la reacción fibrosa y cicatricial resultante era patente, persistiendo una gran cantidad de colágeno.

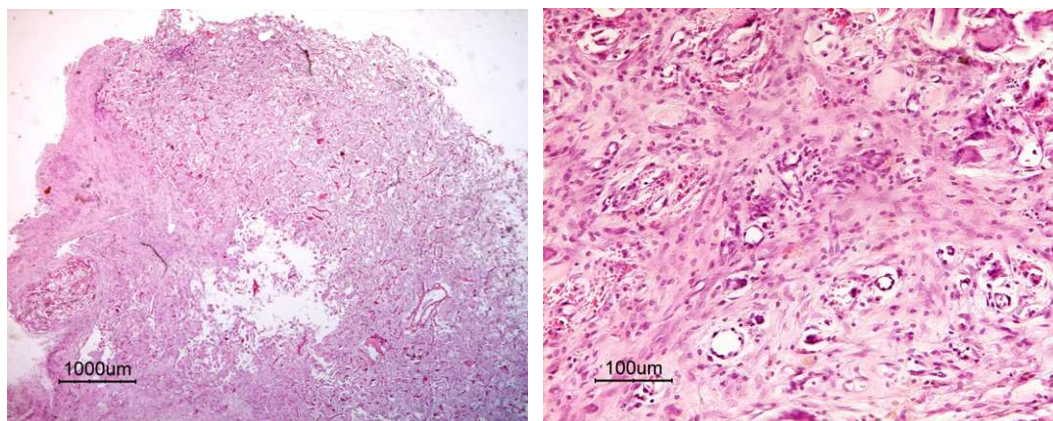


Figura 47: Reacción inflamatoria perimplante en una muestra de colágeno I/III con nanoHA a los 15 días de su implantación, con una gran respuesta fibrótica y cicatricial. A la derecha puede verse la proliferación fibrovascular y reacción a cuerpo extraño. Tinción con HE. Fotos realizadas por el servicio de Anatomía Patológica del HPA.

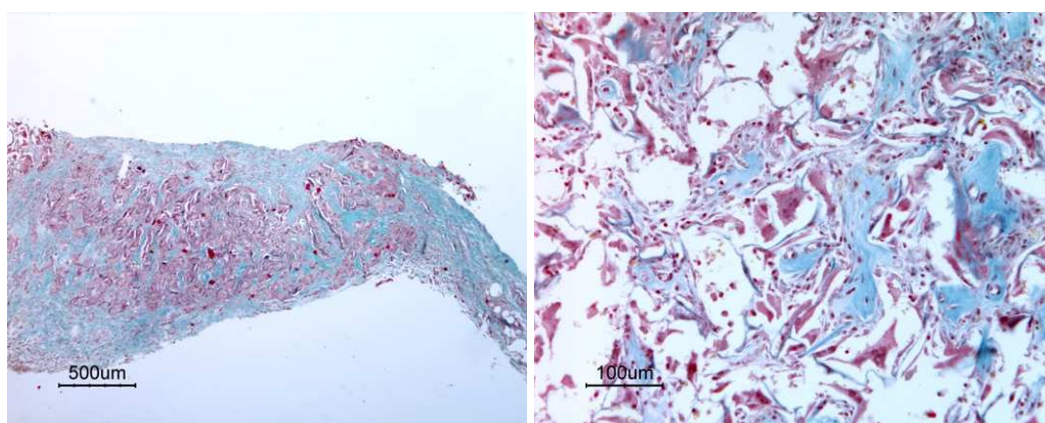


Figura 48: Reacción inflamatoria perimplante en una muestra de colágeno I/III con nanoHA a los 15 días de su implantación, con una gran respuesta fibrótica y cicatricial. Aumento del colágeno entre fibras que conservan sus caracteres tintoriales. El aumento de fibras verdes (colágeno) es probablemente debido a neoformación. A la derecha, se acompaña de reacción a cuerpo extraño. Tinción tricrómico de Masson. Fotos realizadas por el servicio de Anatomía Patológica del HPA.

Con ninguno de los dos tipos de implante se ha podido demostrar la formación de tejido óseo *de novo*, descartándose de esta forma el posible potencial osteogénico u osteoinductor de nuestro biocompuesto de estudio en el modelo subcutáneo, quizá por el poco tiempo de implantación o porque los biomateriales utilizados presentan unas características de porosidad que facilitan la infiltración celular y la biodegradación de los mismos.

3.3.- *IMPLANTES INTRAÓSEOS*

Como veremos en detalle a continuación en los diferentes grupos de estudio, los biomateriales fueron implantados y mantenidos durante diferentes tiempos: 15, 30 y 60 días según el grupo correspondiente.

Hay que destacar en primer lugar que el factor tiempo de implantación presentó poco efecto en el resultado final observado dentro de cada grupo, apareciendo las principales diferencias entre grupos con independencia de dicho tiempo de implantación.

3.3.1.- *Grupo 2: generación de defecto óseo sin aporte de ningún sustituto*

Como primer grupo control se realizó el fresado del canal medular del fémur distal sin introducir a continuación ningún compuesto con intención de valorar la regeneración ósea normal en las ratas Wistar, y comparar estos resultados con la posterior aplicación de los diferentes compuestos. Se valoraron muestras con dos tiempos de seguimiento diferentes, a los 15 días (1 animal, 2 muestras) y a los 60 días (1 animal, 2 muestras).

A los 15 días de la generación de defecto óseo sin implantación puede observarse que el defecto realizado se encuentra relleno con tejido de granulación, sin apreciarse médula ósea. No se aprecia neoformación ósea. El cartílago de crecimiento que fue atravesado durante la fase de fresado mantiene su discontinuidad.

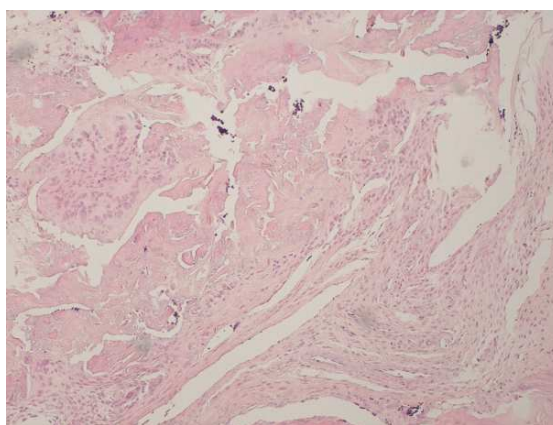


Figura 49: Defecto óseo sin relleno (sólo fresado) a los 15 días. Tinción de HE. Foto realizada por el servicio de Anatomía Patológica del HUPHM.

Por otra parte, a los 60 días de la generación del defecto sin implantación se observa una situación similar a la previa pero en una fase más avanzada, en la que el defecto óseo creado se ha sustituido por médula hematopoyética, mientras que el cartílago de crecimiento mantiene su discontinuidad. Siguen sin apreciarse espículas óseas en la zona del defecto generado.

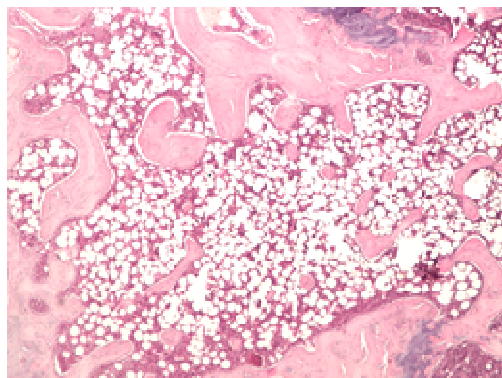


Figura 50: Defecto óseo sin relleno (sólo fresado) a los 60 días. Tinción de HE. Foto realizada por el servicio de Anatomía Patológica del HUPHM.

3.3.2.- Grupo 3: defecto óseo relleno de colágeno I/III

En el segundo grupo control el defecto óseo se rellenó con un cilindro de colágeno I/III, y se mantuvo implantado durante tres tiempos diferentes: 15, 30 y 60 días, interviniendo en cada tiempo a 3 animales (6 muestras).

A los 15 días de implantación puede observarse proliferación de fibras de colágeno finas en la zona del defecto y la presencia de tejido de granulación, situación similar a los casos en los que no se implantó nada. El cartílago de crecimiento mantiene su discontinuidad. En alguna preparación puede apreciarse médula ósea activa.

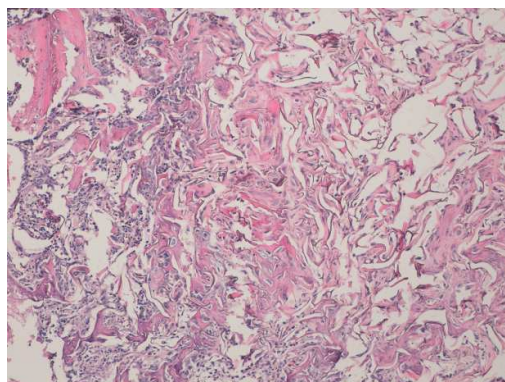


Figura 51: Defecto óseo relleno con colágeno I/III a los 15 días. Tinción de HE. Foto realizada por el servicio de Anatomía Patológica del HUPHM.

Al analizar las muestras tras 30 días de implantación se objetiva la presencia de pequeños islotes de un hueso inmaduro desorganizado, con menor cantidad de tejido de granulación. Se aprecia también la aparición de médula ósea hematopoyética. El cartílago de crecimiento permanece discontinuo.

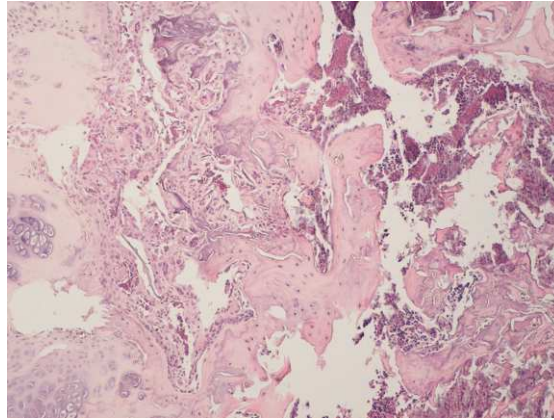


Figura 52: Defecto óseo relleno con colágeno I/III a los 30 días. Tinción de HE. Foto realizada por el servicio de Anatomía Patológica del HUPHM.

Por último, en las muestras que permanecieron 60 días implantadas pudo comprobarse la presencia de hueso compacto en muy escasa cantidad. En estos casos el defecto generado en el cartílago de crecimiento se encontraba cerrado por este tejido óseo. Se aprecia médula ósea con abundantes adipocitos.

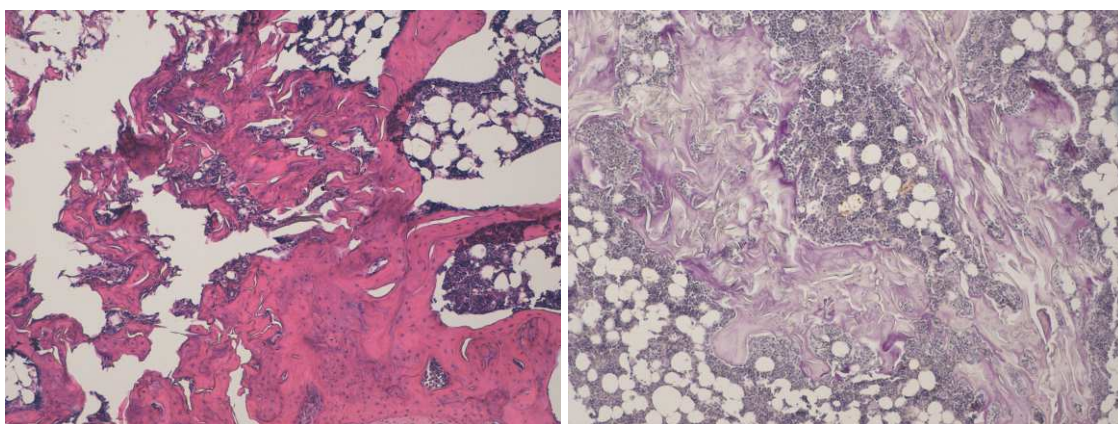


Figura 53: Defecto óseo relleno con colágeno I/III a los 60 días. Tinción de HE a la izquierda, y de PAS a la derecha. Fotos realizadas por el servicio de Anatomía Patológica del HUPHM.

3.3.3.- Grupo 4: relleno del defecto óseo con hidroxiapatita comercial Engipore®.

Con el tercer grupo control el defecto óseo se rellenó con pequeñas partículas de un sustituto óseo de hidroxiapatita estructural (Engipore®). Los tiempos de implantación y el número de muestras fueron los mismos que en el grupo previo: 15 días (3 animales, 6 muestras), 30 días (3 animales, 6 muestras) y 60 días (3 animales, 6 muestras).

En todas las muestras analizadas puede apreciarse la persistencia del material, que en la tinción de HE tomó un color marronáceo como puede verse en las imágenes, alrededor del cual se van conformando trabéculas óseas progresivamente más organizadas en la zona del defecto óseo. La zona del defecto generado se encuentra rellena en su práctica totalidad por la HA comercial y las trabéculas óseas neoformadas. Se observa la presencia de una médula ósea hematopoyética que progresivamente va siendo sustituida por tejido adiposo. Los resultados observados en todas estas muestras no presentan grandes diferencias según va aumentando el tiempo de seguimiento.

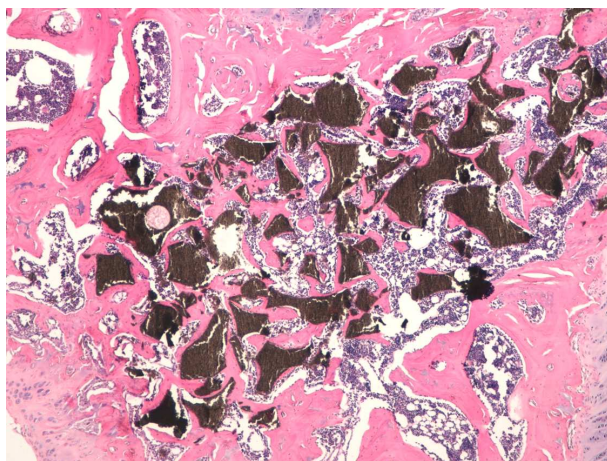


Figura 54: Defecto óseo relleno con hidroxiapatita comercial (Engipore®) a los 15 días. Tinción de HE.
Foto realizada por el servicio de Anatomía Patológica del HUPHM.

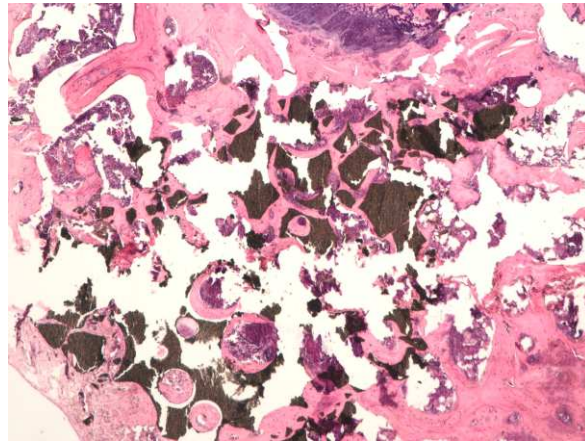


Figura 55: Defecto óseo relleno con hidroxiapatita comercial (Engipore®) a los 30 días. Tinción de HE.
Foto realizada por el servicio de Anatomía Patológica del HUPHM.

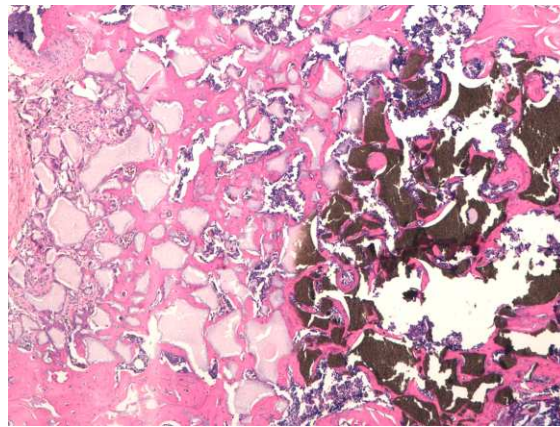


Figura 56: Defecto óseo relleno con hidroxiapatita comercial (Engipore®) a los 60 días. Tinción de HE.
Foto realizada por el servicio de Anatomía Patológica del HUPHM.

3.3.4.- Grupo 1: biocompuesto de colágeno I/III, nanoHA y proteína SPARC

Por último, en el grupo de estudio principal, el defecto óseo se rellenó con pequeños cilindros de colágeno I/III, nanoHA y proteína SPARC. Los tiempos de implantación y el número de muestras fueron: 15 días (3 animales, 6 muestras), 30 días (3 animales, 6 muestras) y 60 días (3 animales, 6 muestras).

En comparación con el resto de biomateriales empleados llama la atención que en las preparaciones con el biocompuesto objeto de este estudio se aprecia un grado de madurez ósea muy avanzado desde los 15 días de implantación como puede verse en la figura 57 a gran aumento. En estos casos el defecto óseo se encuentra prácticamente

cerrado y sustituido por hueso compacto. El cartílago de crecimiento mantiene su discontinuidad al ser rellenado por tejido óseo neoformado, y la médula ósea tiene características hematopoyéticas.

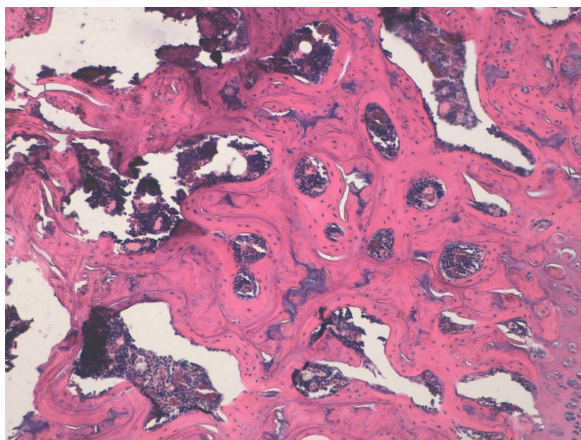


Figura 57: Defecto óseo relleno con colágeno I/III, nanoHA y proteína SPARC a los 15 días. Puede observarse la presencia de hueso compacto y médula ósea hematopoyética. Tinción de HE. Foto realizada por el servicio de Anatomía Patológica del HUPHM.

Si empleamos un aumento mayor para ver con más resolución podemos observar que con la implantación del biocompuesto se activa un proceso de osificación “*de novo*”. Se produce un estímulo de la reparación ósea sobre el defecto que hemos generado que finaliza con la presencia de osteoblastos y osteoclastos, alrededor de una espícula neoformada con presencia de osteocitos sobre una matriz primero de osteoide y más tarde con calcio. La aparición de ambas estirpes celulares indica que la espícula ya es activa e indiferenciable de las preexistentes aunque este proceso se realiza sobre el eje de las mallas de colágeno.

Podríamos por tanto concluir que lo que ocurre fisiológicamente es una osificación iniciada a partir de elementos conjuntivos de la médula ósea o del propio tejido conjuntivo de respuesta inicial cicatricial aprovechando los ejes colágenos del biocompuesto de colágeno I/III, nanoHA y proteína SPARC (C, en la figura 58). Luego aparecen los osteoblastos (A), la matriz ósea (D) que primero es muy inespecífica, como la del tejido conjuntivo, y los osteoclastos (B) que al principio son muy escasos y a medida que se establece claramente la osificación van aumentando su número. Este comportamiento no se observa con el resto de biomateriales implantados.



Figura 58: Defecto óseo relleno con colágeno I/III, nanoHA y proteína SPARC a los 15 días. Pueden apreciarse osteoblastos (A), osteoclastos (B), fibras colágenas del biocompuesto (C) y matriz ósea (D). Explicación en el texto superior. Tinción de HE. Foto realizada por el servicio de Anatomía Patológica del HPA.

A los 30 días de la implantación la presencia de hueso compacto ha aumentado y la médula ósea hematopoyética va siendo sustituida progresivamente por adipocitos. La zona del cartílago de crecimiento que ha sido atravesada para la realización del defecto se sustituye progresivamente por tejido óseo neoformado como puede verse en la figura 59 panorámica.

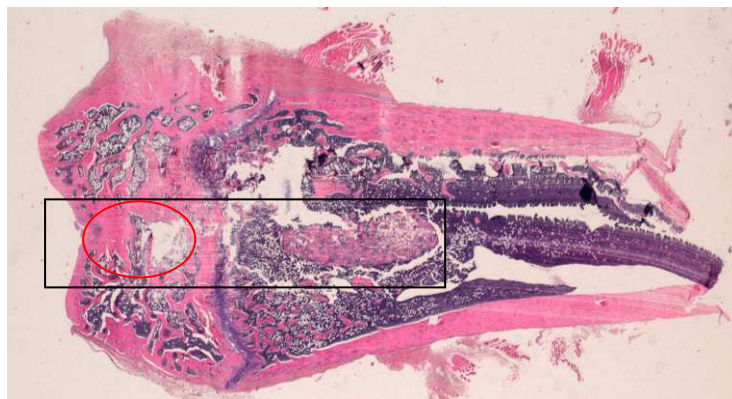


Figura 59: Defecto óseo relleno con colágeno I/III, nanoHA y proteína SPARC a los 30 días. La zona rectangular representa el punto de inserción del biocompuesto. La zona circular corresponde a la zona subcondral de entrada, que puede visualizarse a mayor aumento en la imagen siguiente. Tinción de HE. Foto realizada por el servicio de Anatomía Patológica del HUPHM.

Ha quedado demostrado que la mayor dificultad en los procesos de osificación se localiza en la reparación de la zona del defecto más superficial, ya que en esta zona

se encuentra el periostio que tiene una proliferación de tejido conjuntivo muy activa e inmediata y que puede entorpecer la formación ósea. En las zonas de defecto más profundas probablemente el papel de la médula ósea sea muy importante y ayude a acelerar la reparación^(168, 275).

En la figura 60 puede observarse la gran cantidad de tejido óseo compacto neoformado a nivel subcondral en la zona de inserción del biocompuesto de estudio a los 30 días de la implantación del mismo.

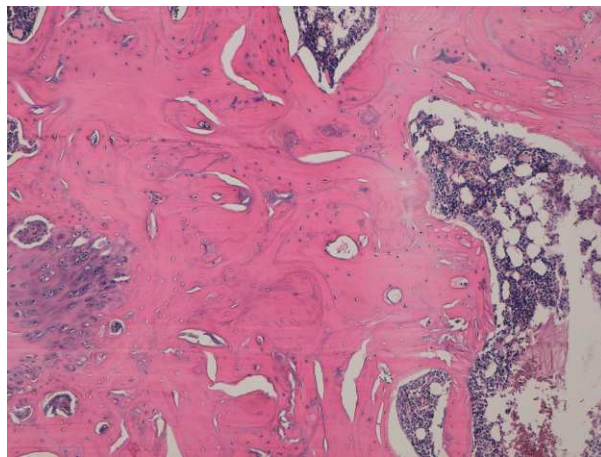


Figura 60: Defecto óseo relleno con colágeno I/III, nanoHA y proteína SPARC a los 30 días. Hueso compacto denso de la zona subcondral, que corresponde con la zona circular de la figura 59. Médula hematopoyética con adipocitos. Tinción de HE. Foto realizada por el servicio de AP del HUPHM.

En la figura 61 puede observarse una visión panorámica de la zona de implantación del biocompuesto en estudio a los 30 días de implantación. Puede apreciarse la entrada a través de la zona condral articular, el hueso epifisiario, la fisis, el hueso metafisario y la medular. Las imágenes sucesivas muestran estas zonas en detalle.

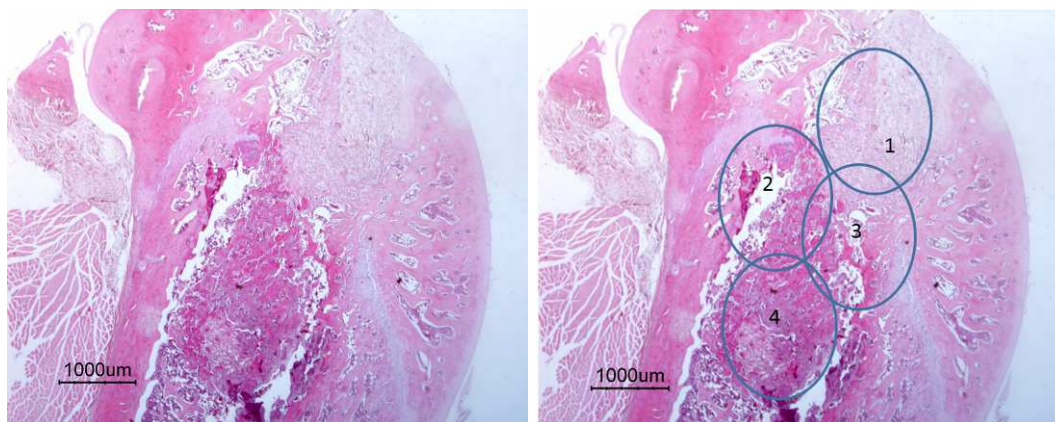


Figura 61: Defecto óseo relleno con colágeno I/III, nanoHA y proteína SPARC a los 30 días. Visión panorámica de la zona de implantación. A la derecha se localizan diferentes áreas que serán explicadas a continuación. Tinción de HE. Fotos realizadas por el servicio de AP del HPA.

En la figura 62, correspondiente con el área 1 de la figura 61, se representa la zona más superficial del hueso, la zona epifisiaria, donde puede apreciarse un grado de madurez ósea intermedio. El defecto óseo se encuentra prácticamente cerrado y sustituido por hueso compacto en proceso de maduración.

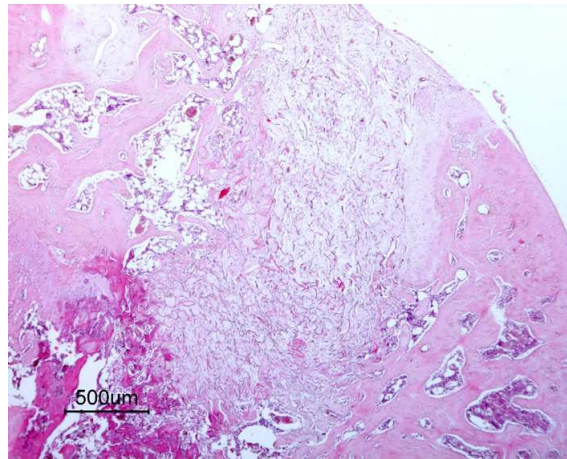


Figura 62: Defecto óseo relleno con colágeno I/III, nanoHA y proteína SPARC a los 30 días. Detalle del área 1 de la figura 61. Explicación en el texto. Tinción HE. Foto realizada por el servicio de AP del HPA.

En la figura 63, que corresponde en esta ocasión al área 2 de la figura 61, puede apreciarse la zona epifisiaria en contacto con la fisis de crecimiento, que mantiene su discontinuidad.

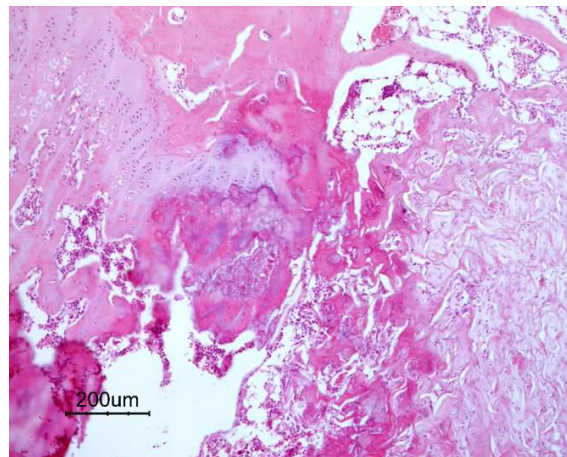


Figura 63: Defecto óseo relleno con colágeno I/III, nanoHA y proteína SPARC a los 30 días. Detalle del área 2 de la figura 61. Explicación en el texto. Tinción HE. Foto realizada por el servicio de AP del HPA.

En esta otra imagen (figura 64), que corresponde al área 3 de la figura 61, y que representa la zona metafisaria del hueso, puede apreciarse que el grado de madurez óseo es más avanzado.

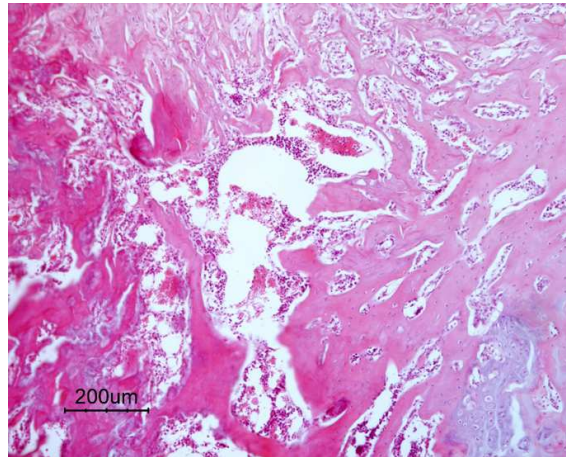


Figura 64: Defecto óseo relleno con colágeno I/III, nanoHA y proteína SPARC a los 30 días. Detalle del área 3 de la figura 61. Explicación en el texto. Tinción HE. Foto realizada por el servicio de AP del HPA.

Para finalizar los detalles ampliados de la figura 61, en esta imagen se presenta el área 4, y en ella puede apreciarse la médula ósea que mantiene sus características hematopoyéticas en esta preparación, apreciándose adipocitos en su espesor.

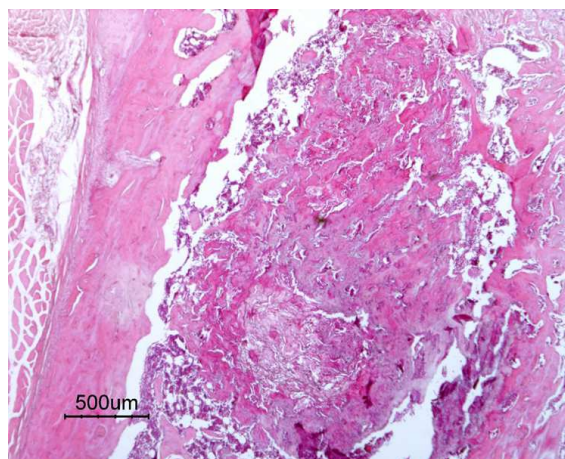


Figura 65: Defecto óseo relleno con colágeno I/III, nanoHA y proteína SPARC a los 30 días. Detalle del área 4 de la figura 61. Explicación en el texto. Tinción HE. Foto realizada por el servicio de AP del HPA.

Por último, en las muestras en las que el biocompuesto de colágeno I/III, nanoHA y proteína SPARC permaneció implantado durante 60 días puede observarse una restitución ósea hasta conseguir unas características muy similares a la normalidad. El defecto óseo se encuentra completamente cerrado y sustituido por hueso laminar maduro, la médula ósea presenta un mayor número de adipocitos que la asemejan a la médula ósea amarilla normal, y la zona del defecto del cartílago de crecimiento se encuentra cerrada y ha sido sustituida por tejido óseo. Se puede concluir que el proceso

de osificación ha finalizado, situación que no hemos encontrado con el resto de compuestos utilizados.

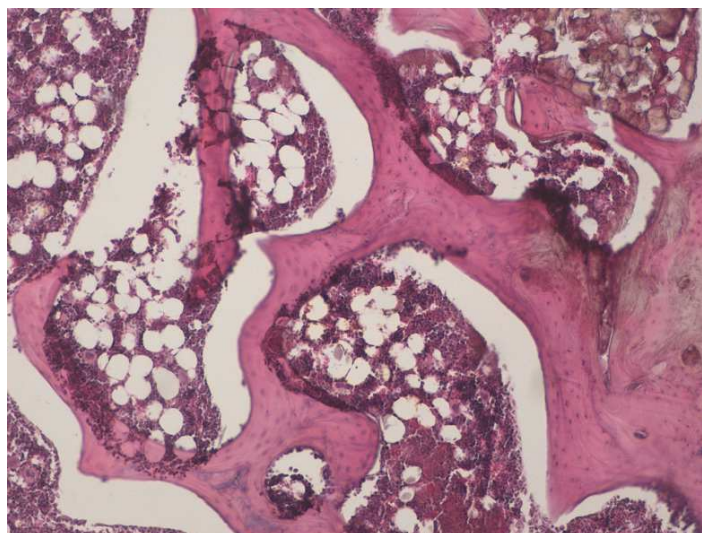


Figura 66: Defecto óseo relleno con colágeno I/III, nanoHA y proteína SPARC a los 60 días. Hueso compacto denso. Médula hematopoyética con adipocitos. Tinción de HE. Foto realizada por el servicio de AP del HUPHM.

ESCALA DE HEIPLE.

Los resultados obtenidos con las muestras de los distintos grupos en diferentes tiempos de seguimiento, y al aplicarse la escala de valoración de Heiple, fueron los siguientes:

	Modelo Heiple	15 días							30 días							60 días						
		1	2	3	4	5	6	M	1	2	3	4	5	6	M	1	2	3	4	5	6	M
Sólo fresado	- grado de madurez ósea	0	0					0								0						0
	- presencia y calidad de médula ósea	0	0					0								1						1
	- continuidad del defecto-hueso normal	0	0					0								0						0
	- formación ósea periférica	0	0					0								0						0
Colágeno I/III	- grado de madurez ósea	2	2	2	2	1	2	2	3	3	2				3	3	3	3	3			3
	- presencia y calidad de médula ósea	0	0	0	1	1	0	0	1	2	1				1	2	1	2	2			2
	- continuidad del defecto-hueso normal	0	0	1	0	0	0	0	1	1	1				1	2	2	1	2			2
	- formación ósea periférica	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1				1	2	2	2	2			2
HA comercial Engipore	- grado de madurez ósea	3	3	4	3	3	3	3	4	3	4	4	3	4	4	4	4	4				4
	- presencia y calidad de médula ósea	1	2	1	1	2	1	1	2	2	2	1	2	2	2	2	1	2				2
	- continuidad del defecto-hueso normal	3	3	3	2	3	3	3	4	4	3	4	4	4	4	4	4	4				4
	- formación ósea periférica	3	3	3	2	2	3	3	3	3	3	3	2	3	3	3	3	3				3
Colágeno I/III+nHA + proteína SPARC	- grado de madurez ósea	4	4	3	4			4	4						4	5	5	4	5			5
	- presencia y calidad de médula ósea	1	1	1	1			1	2						2	2	2	2	2			2
	- continuidad del defecto-hueso normal	3	2	3	3			3	4						4	5	4	5	5			5
	- formación ósea periférica	3	3	3	3			3	3						3	3	3	3				3

Tabla 27: Resultados histológicos de las muestras intraóseas valoradas. M: mediana.

	Modelo Heiple	15 días		30 días		60 días	
		N	Med(P25;P75)	N	Med(P25;P75)	N	Med(P25;P75)
Sólo fresado.	- grado de madurez ósea	2	0 (0; 0)	0	--	1	0
	- presencia y calidad de médula ósea	2	0 (0; 0)	0	--	1	1
	- continuidad del defecto-hueso normal	2	0 (0; 0)	0	--	1	0
	- formación ósea periférica	2	0 (0; 0)	0	--	1	0
Colágeno I/III	- grado de madurez ósea	6	2 (2; 2)	3	3 (2; 3)	4	3 (3; 3)
	- presencia y calidad de médula ósea	6	0 (0; 1)	3	1 (1; 2)	4	2 (1.5; 2)
	- continuidad del defecto-hueso normal	6	0 (0; 0)	3	1 (1; 1)	4	2 (1.5; 2)
	- formación ósea periférica	6	0 (0;0)	3	1 (1; 1)	4	2 (2; 2)
HA comercial (Engipore)	- grado de madurez ósea	6	3 (3; 3)	6	4 (3; 4)	3	4 (4; 4)
	- presencia y calidad de médula ósea	6	1 (1;2)	6	2 (2; 2)	3	2 (1; 2)
	- continuidad del defecto-hueso normal	6	3 (3; 3)	6	4 (4; 4)	3	4 (4; 4)
	- formación ósea periférica	6	3 (2; 3)	6	3 (3; 3)	3	3 (3; 3)
Colágeno I/III+nHA+ proteína SPARC	- grado de madurez ósea	4	4 (3.5; 4)	1	4	4	5 (4.5; 5)
	- presencia y calidad de médula ósea	4	1 (1; 1)	1	2	4	2 (2; 2)
	- continuidad del defecto-hueso normal	4	3 (2.5; 3)	1	4	4	5 (4.5; 5)
	- formación ósea periférica	4	3 (3; 3)	1	3	4	3 (3; 3)

Tabla 28: Resultados del modelo de valoración morfológico de Heiple en las distintas muestras. Se muestran el número de animales, las medianas y los percentiles 25 y 75.

Debido a cuestiones éticas, el tamaño muestral con el que se contó para este estudio es bajo, y se han considerado las diferentes mediciones que pertenecen a un mismo animal como mediciones independientes. Haciendo balance entre la pérdida de valor estadístico por hacer esta consideración, y la pérdida de datos derivada de su tratamiento como valores correlacionados, se ha llegado a la conclusión que no invalida los resultados y mejora sustancialmente el tamaño muestral.

A continuación se expone la representación gráfica de los diferentes grupos de estudio y en distintos tiempos de implantación, empleando para ello la mediana de cada parámetro analizado. Para contrastar diferencias se realizó la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis.

Aparece indicado en cada gráfico la presencia de significación estadística al comparar cada parámetro de la escala de Heiple entre los diferentes grupos y tiempos de implantación. En caso de encontrar diferencias estadísticamente significativas entre alguno de los cuatro grupos, se realizaron pruebas a posteriori mediante tests de Mann-Whitney comparando dos a dos todos los grupos, ajustando por la corrección de Bonferroni, siendo en estos casos el nivel de significación requerido de 0,008.

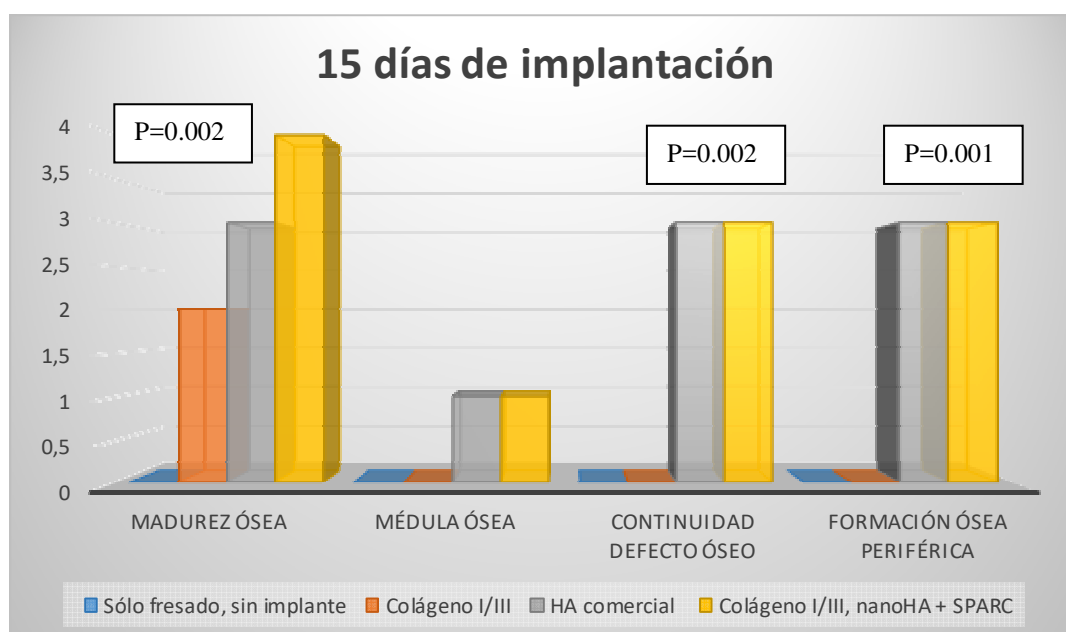


Figura 67: Representación gráfica de la mediana de los parámetros estudiados a los 15 días de implantación en los diferentes grupos.

A los 15 días de implantación se observaron las siguientes diferencias en los distintos parámetros estudiados cuando realizamos las comparaciones dos a dos entre grupos:

15 días	Grupo de comparación	Grupo de comparación	Significación estadística, p
Grado de madurez ósea	Colágeno I/III+nHA+ proteína SPARC	Colágeno I/III	0,005
	Colágeno I/III	HA comercial Engipore®	0,001
Continuidad del defecto-hueso normal	Colágeno I/III+nHA+ proteína SPARC	Colágeno I/III	0,005
	Colágeno I/III	HA comercial Engipore®	0,001
Formación ósea periférica	Colágeno I/III+nHA+ proteína SPARC	Colágeno I/III	0,002
	Colágeno I/III	HA comercial Engipore®	0,002

Tabla 29: Tabla de comparación dos a dos con significación estadística a los 15 días de implantación.

Hay que destacar que no se observaron diferencias en las comparaciones con el grupo de sólo fresado, probablemente debido al reducido tamaño muestral de dicho grupo (n=2).

A los 30 días de implantación, los resultados fueron los siguientes:

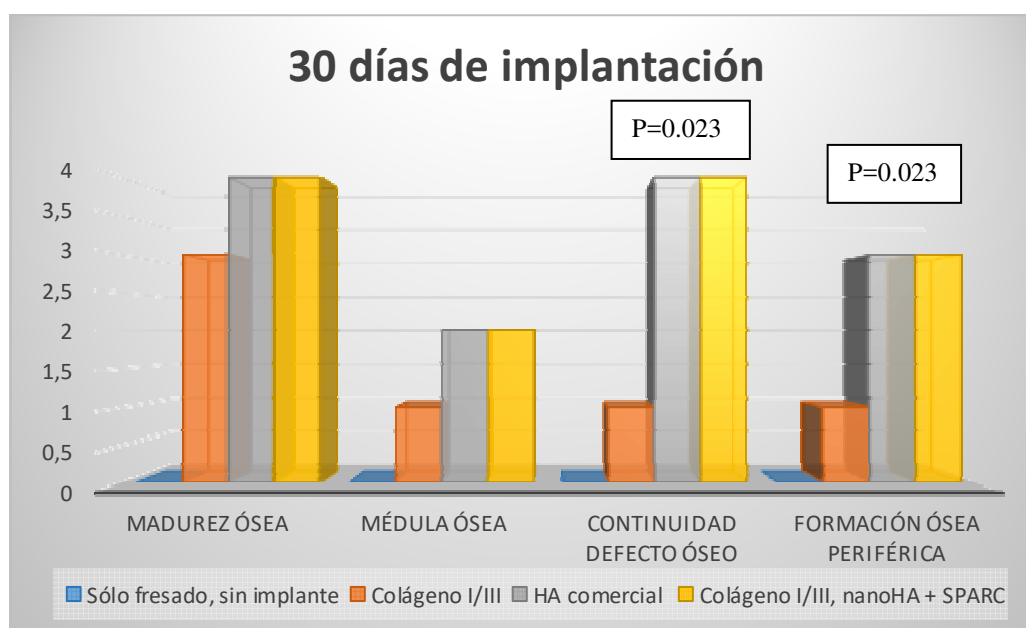


Figura 68: Representación gráfica de la mediana de los parámetros estudiados a los 30 días de implantación en los diferentes grupos.

No se observaron diferencias estadísticamente significativas cuando se realizaron comparaciones directas dos a dos entre grupos en cada parámetro analizado. Hay que destacar que para este tiempo de implantación no se disponía de muestras en el grupo de sólo fresado.

Por último, a los 60 días de implantación de representación gráfica fue:

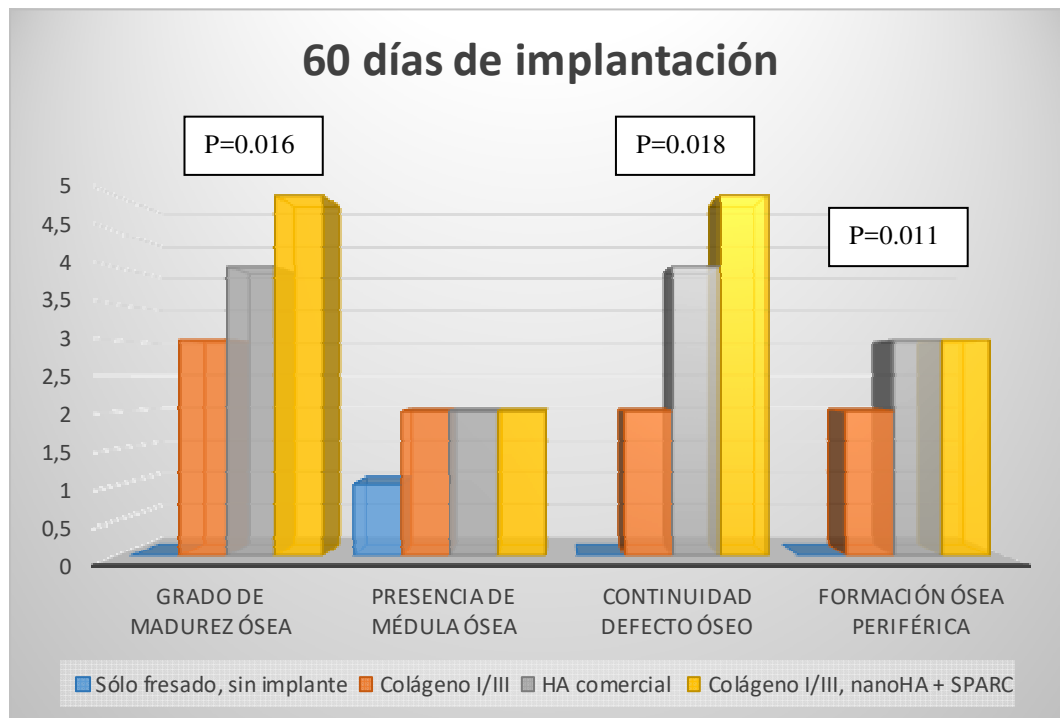


Figura 69: Representación gráfica de la mediana de los parámetros estudiados a los 60 días de implantación en los diferentes grupos.

En el grupo de 60 días de implantación, cuando se realizaron comparaciones directas dos a dos entre grupos para cada parámetro, sólo se encontraron diferencias estadísticamente significativas al comparar la formación ósea periférica entre el grupo de Colágeno I/III+nHA+ proteína SPARC y el grupo de Colágeno I/III, con una $p=0,008$.

Al igual que con los otros tiempos de seguimiento, no se observaron diferencias en las comparaciones con el grupo de sólo fresado, probablemente debido al reducido tamaño muestral de dicho grupo.

La representación gráfica mediante diagramas de cajas y bigotes para las diferentes características histológicas estudiadas sería la siguiente:

1.- Grado de madurez ósea

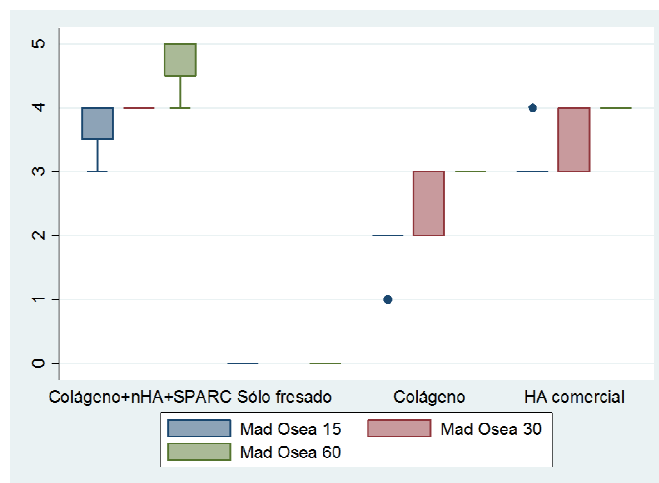


Figura 70: Representación gráfica mediante diagramas de cajas y bigotes del grado de madurez ósea

En la figura 70 se observa que el grupo de colágeno I/III+nanoHA+SPARC tiene desde los 15 días un valor mayor en cuanto a grado de maduración ósea, y aumenta con el tiempo de seguimiento. El grupo de HA comercial, tiene un grado menor, y también aumenta con el tiempo. El grupo de colágeno, un valor menor muy bajo a los 15 días, pero igualmente aumenta con el tiempo. En el grupo de solo frosado no se aprecia neoformación ósea en ambos tiempos de seguimiento analizados.

2.- Presencia y calidad de médula ósea

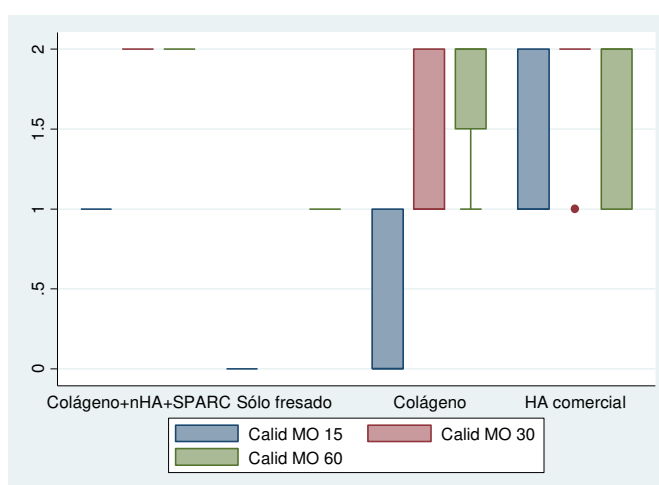


Figura 71: Representación gráfica mediante diagramas de cajas y bigotes de la presencia de médula ósea.

En la figura 71, vemos que en el grupo de colágeno I/III+nanoHA+SPARC aumenta la calidad de médula ósea formada con el tiempo, pero sin llegar a formar médula madura. El grupo de HA comercial presenta un comportamiento similar, con valores más dispersos que el grupo anterior. En el grupo de colágeno, aumenta con el tiempo, partiendo de una situación de inmdurez a los 15 días, y sin llegar a alcanzar los valores de los otros grupos. El grupo de solo fresado, pasa de una ausencia de médula ósea en la zona del defecto a los 15 días, a una médula hematolopoyéticamente activa pero no madura a los 60 días de seguimiento.

3.- Continuidad del defecto-hueso normal:

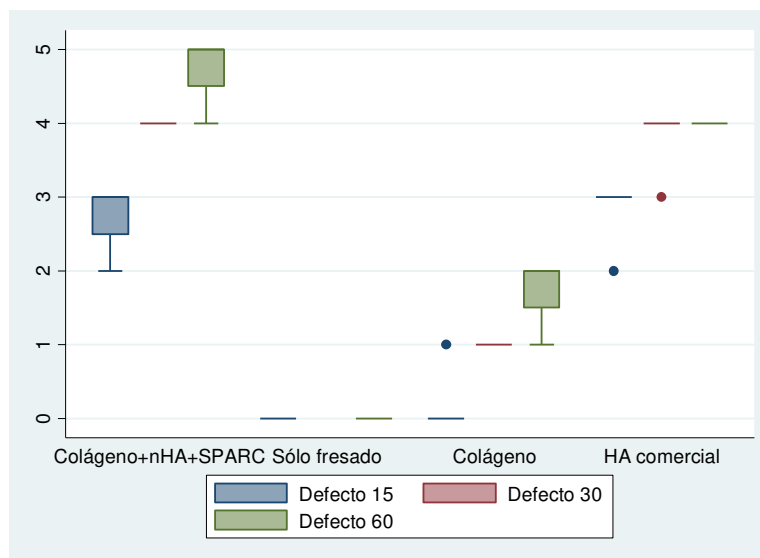


Figura 72: Representación gráfica mediante diagramas de cajas y bigotes de la continuidad del defecto-hueso normal.

En cuanto al cierre del defecto óseo generado, en la figura 72 se observa que el grupo de colágeno I/III+nanoHA+SPARC tiene desde los 15 días un defecto practicamente cerrado, consiguiendo un cierre completo a 30 y 60 días de seguimiento. El grupo de HA comercial tiene un grado menor de cierre del defecto, y también aumenta con el tiempo, sin llegar a un cierre completo. En el grupo de colágeno I/III el defecto se mantiene a los 15 días, iniciandose su cierre con el tiempo, sin llegar a completar un tercio del mismo a los 60 días. En el grupo de solo fresado se mantiene el defecto en todos los tiempos, presentando una ausencia de formación ósea en el defecto generado, considerándose por ello este defecto de tamaño crítico.

4.- Formación ósea periférica:

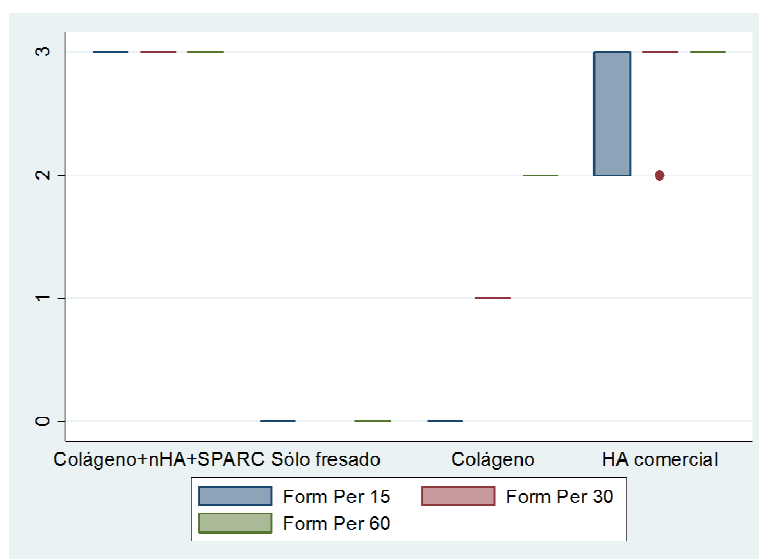


Figura 73: Representación gráfica mediante diagramas de cajas y bigotes de la formación ósea periférica.

Por último, atendiendo al tejido óseo periférico al defecto, en la figura 73 se observa que el grupo de colágeno I/III+nanoHA+SPARC tiene desde los 15 días una buena respuesta del mismo, que se mantiene al aumentar el tiempo de implantación. El grupo de HA comercial, tiene un grado menor de formación ósea periférica, aunque aumenta con el tiempo presentando un comportamiento similar al grupo de estudio. Sin embargo, en el grupo de colágeno I/III a los 15 días de seguimiento no se aprecia formación ósea en el tejido periférico, apareciendo con el tiempo hasta presentar un valor moderado. En el grupo de solo fresado no se aprecia formación ósea periférica al defecto generado en los dos tiempos de seguimiento analizados, en consonancia una vez más con su comportamiento con defecto de tamaño crítico.

V.- DISCUSIÓN

1.- SITUACIÓN ACTUAL

La búsqueda de sustitutos óseos adecuados continúa siendo un reto importante en el momento actual. Se calcula que anualmente más de 1.100.000 procedimientos quirúrgicos necesitan la resección parcial de hueso y la utilización de injerto óseo en los Estados Unidos, con un coste total estimado de 2000 millones de euros⁽¹⁵⁴⁾.

Son múltiples los procedimientos dentro del campo de la Cirugía Ortopédica que pueden necesitar el aporte de injertos o sustitutos óseos ya que sobrepasan la capacidad de autorregeneración ósea, como las cirugías tumorales, cirugías protésicas de revisión, fracturas metafisarias impactadas, retardos de consolidación o pseudoartrosis, infecciones y las artrodesis. El cirujano ortopédico debe tener en cuenta una gran variedad de factores a la hora de decidir el injerto o sustituto óseo ideal para cada ocasión, y debe conocer y comprender el ambiente biológico y las propiedades biomecánicas del injerto y del lecho receptor donde se va a aplicar.

Existen diversos tipos de injertos o sustitutos óseos, en función de su origen, composición biológica, método de conservación y propiedades biomecánicas⁽⁸¹⁾. El autoinjerto óseo sigue considerándose hoy el día el “patrón oro”, y es el más utilizado en la práctica clínica debido a su histocompatibilidad completa y fácil obtención, y por presentar las propiedades de osteogénesis, osteoinducción y osteoconducción⁽¹²⁰⁾. Pero presenta importantes desventajas como la limitada cantidad de volumen obtenido y la morbilidad asociada a su extracción, siendo frecuentes el dolor en la zona donante, la infección y la hemorragia en el lecho⁽²⁹⁰⁾.

El aloinjerto óseo extraído de cadáver ofrece la ventaja teórica de poder obtener grandes cantidades y con diferentes formas y tamaños, evitando la morbilidad del autoinjerto y acortando los tiempos quirúrgicos. Entre los inconvenientes hay que destacar que no tiene capacidad osteogénica presentando una incorporación más lenta al aparecer una respuesta inmunógena, y que tiene un riesgo potencial de transmisión de enfermedades^(65, 181, 190, 242).

En las últimas décadas se está produciendo un gran auge en el desarrollo y comercialización de diferentes sustitutos óseos, tanto artificiales sintéticos como biológicos desnaturalizados, que puedan sustituir al aloinjerto y autoinjerto. Su función básica consiste en proporcionar una matriz o andamiaje que sirva de soporte mecánico temporal, y que esté dotado de una arquitectura porosa que será colonizada por los osteoblastos del paciente receptor, con la consiguiente formación de hueso⁽⁷³⁾. También pueden ser utilizados formando un biocompuesto con otros biomateriales, como los factores de crecimiento, con lo que dotaríamos a estos sustitutos de capacidad osteoinductora, que no poseen por definición⁽¹²⁰⁾. Estos sustitutos óseos deben ser esterilizables sin pérdida de su bioactividad, y deben poder degradarse de una manera controlada sin generar productos tóxicos y la consiguiente reacción inflamatoria crónica⁽²⁰⁰⁾.

2.- MATERIALES EMPLEADOS EN INGENIERÍA TISULAR ÓSEA

Con la realización de este trabajo se pretende valorar la capacidad osteoinductora y osteoconductora de un nuevo biomaterial compuesto de colágeno I/III, proteína SPARC e hidroxiapatita nanométrica y su utilización como sustituto óseo, así como su tolerabilidad. Para comprender el comportamiento *in vivo* de este biocompuesto es necesario fijarse en su estructura y composición.

2.1.- HIDROXIAPATITA

La HA es uno de los materiales más estudiados y empleados en el diseño de biomateriales para la regeneración ósea al ser un elemento esencial de la arquitectura ósea^(56, 187). Destaca por su bioactividad, osteoconductividad, y por la ausencia de toxicidad y reacciones inflamatorias o inmunógenas con su implantación. La HA se ha empleado también como transportador de sustancias, como antibióticos, debido a sus propiedades osteoconductoras y a su biocompatibilidad^(28, 47, 288). Los estudios tradicionales utilizaban esta HA con un tamaño micrométrico. En los últimos años se ha suscitado un creciente interés en los compuestos de HA sintética con un tamaño nanométrico (nanoHA), ya que se ha visto que esta formulación puede facilitar e incrementar la formación de nuevo tejido óseo, aumentando la adhesión de osteoblastos

(células formadoras de hueso), su proliferación, osteointegración y deposición de mineral cálcico en su superficie, debido al aumento del ratio superficie-volumen ^(96, 161, 239). El empleo de un material de escala nanométrica implica un gran aumento de superficie específica sobre la que pueden actuar las células y macromoléculas del organismo. De hecho, la HA con una formulación nanométrica es uno de los principales componentes del tejido óseo natural.

Entre los diferentes métodos de fabricación de nanoHA hay que destacar la precipitación química en estado húmedo, que requiere temperaturas relativamente bajas y produce nanopartículas de una forma más sencilla que los métodos secos o sólidos, aunque su cristalinidad y el ratio Ca/P es relativamente bajo⁽¹⁸⁵⁾. La HA sintética debe asemejarse todo lo posible al componente natural óseo tanto cristalográficamente como químicamente. La proporción de los diferentes fosfatos cálcicos entre Ca y P es variable, demostrándose que la HA con un ratio Ca/P de 1,67 es el que presenta una mayor estabilidad termodinámica en un ambiente natural (pH > 5,4) y por ello es la proporción más utilizada en la síntesis de sustitutos, y la que se ha conseguido en el compuesto de nuestro trabajo^(79, 161).

2.2.- COLÁGENO

El colágeno es una proteína natural que se encuentra de una manera ubicua en el cuerpo humano y que presenta un gran potencial en ingeniería tisular ósea debido a su abundancia, excelentes propiedades de biocompatibilidad, alta porosidad, facilidad de combinación con otros materiales, fácil procesamiento, baja antigenicidad y biodegradación^(6, 9, 89, 166, 197). Su potencial regenerativo puede aumentar con la adición de otros materiales naturales como los proteoglicanos, facilitando la diferenciación osteogénica de células madre mesenquimales en estudios *in vivo* e *in vitro*^(10, 68).

En el diseño y fabricación de andamios de colágeno existen una serie de parámetros que desempeñan un papel fundamental en las propiedades biomecánicas de los mismos⁽⁶⁷⁾: la estructura y correcta orientación de las fibras y fibrillas, el tamaño del poro y la porosidad total⁽¹⁸²⁾. Estos factores pueden controlarse durante el proceso de

fabricación, existiendo diferentes técnicas que generan distintos tamaños de poro y grado de porosidad^(220, 297). En cuanto a la estructura de los andamios de colágeno, estos pueden adoptar diferentes formas, destacando los hidrogeles, membranas y esponjas, en función de la aplicación que se les vaya a dar⁽⁷³⁾. Por otra parte, se ha podido comprobar en experimentos *in vivo* que la presencia de una mayor porosidad y tamaño del poro favorecen un mayor crecimiento óseo a su través, pero a expensas de disminuir sus propiedades mecánicas. Según diferentes estudios, el tamaño mínimo requerido del poro para facilitar la migración y proliferación celular sería entre 100 y 300 μm ⁽¹²⁶⁾. En el compuesto de colágeno I/III, nanoHA y SPARC que hemos utilizado en este trabajo el tamaño de los poros que se ha conseguido era de $208 \pm 65 \mu\text{m}$, coincidiendo por tanto con el objetivo buscado⁽¹⁶¹⁾.

El entrecruzamiento del colágeno es el proceso mediante el cual se forman enlaces iónicos y covalentes entre las cadenas individuales, dotando a los sustitutos óseos de unas propiedades mecánicas significativamente mejoradas. Pueden utilizarse métodos físicos o químicos para realizar este entrecruzamiento. Para la obtención del sustituto de este trabajo, se realizó un doble proceso de entrecruzamiento, tanto físico (deshidrotérmico) como químico (EDAC:NHS). Este doble entrecruzamiento ha demostrado que mejora las propiedades mecánicas de los sustitutos óseos⁽²¹³⁾, aumentando la diferenciación, proliferación y migración celular, y evitando el potencial efecto tóxico de otros métodos químicos⁽⁸⁷⁾.

2.3.- COMPUESTOS DE COLÁGENO-HIDROXIAPATITA

La utilización de sustitutos óseos compuestos de colágeno e HA parece resolver los inconvenientes de la utilización de cada uno de estos materiales en forma de monómeros, mejorando las propiedades mecánicas y la resistencia del colágeno aislado pero manteniendo su alta porosidad y respuesta osteogénica, y disminuyendo la fragilidad de la cerámica⁽¹³⁷⁾. Diferentes trabajos se han publicado comentando las ventajas de la utilización de compuestos de colágeno e HA en ingeniería tisular ósea^(55, 191, 233), presentando buenos resultados en experimentos *in vitro*. Se han propuesto muchos métodos de fabricación de estos compuestos. Ryan y cols^(137, 213), en su estudio de 2014, demostraron que el método de incorporación de la HA en los andamios de

colágeno influye de manera decisiva en la resistencia mecánica, porosidad y tamaño del poro del sustituto formado. Apreciaron que la incorporación de la HA al andamio de colágeno una vez que éste había sido fabricado y liofilizado producía una menor incorporación celular, pero aumentaba significativamente la rigidez y la producción de calcio mediada por células madre mesenquimales. Por contra cuando la fabricación se producía mediante un proceso de mezclado de ambos componentes y previo a la liofilización resultaba un compuesto con una rigidez moderada pero con una mayor atracción e incorporación de osteoblastos, mejorando su comportamiento biológico.

Este segundo método de fabricación, en el que primero se produce una precipitación *in situ* de la HA sobre el colágeno y posteriormente un proceso de liofilización, es el que han seguido Shen y cols⁽²²¹⁾ para la elaboración de un nanocompuesto de colágeno e HA, consiguiendo partículas de nanoHA de entre 50 y 100 µm. Refieren que el compuesto así formado presenta unas propiedades mecánicas mejoradas respecto a las matrices de colágeno aisladas, pero no aportan datos de experimentación animal. Para la fabricación del compuesto en nuestro trabajo también se siguió un modelo similar a los anteriores, partiendo de una co-suspensión acuosa de colágeno y nanoHA, seguido de un posterior proceso de liofilización y doble entrecruzamiento físico y químico.

Diversos estudios aportan datos de modelos de experimentación animal con la utilización de compuestos de colágeno e HA. Hay que destacar dos particularidades de la bibliografía revisada: la diferente estirpe animal elegida en estos estudios así como la diferente localización anatómica, y la ausencia de homogeneidad a la hora de transmitir los resultados, dificultando por tanto la comparación directa de los mismos. Pero los resultados clínicos de estos primeros estudios demostraron unas tasas de éxito limitadas⁽⁴⁴⁾. Estos primeros resultados se atribuyeron a la utilización de sustitutos compactos de gran tamaño y con un tamaño de poro reducido, que no podían ser suficientemente penetrados por la vascularización del lecho receptor y no sufrían una degradación y sustitución completa. A la luz de estos resultados, Gleeson y cols⁽⁸⁷⁾ desarrollaron un compuesto de colágeno e HA a partir de un proceso de liofilización y doble entrecruzamiento físico (deshidrotérmico) y químico (EDC:NHS) similar al

empleado con el compuesto que se presenta en nuestro trabajo. En su caso, no utilizaron proteína SPARC como ligando del compuesto. Observaron buenos resultados en estudios *in vitro*, que mejoraban según se incrementaba el grado de saturación del colágeno por HA. Realizaron un estudio piloto experimental en un modelo animal, generando un defecto de tamaño crítico en el cráneo de ratas. A los 28 días de la implantación se pudo apreciar regeneración ósea con un cierre casi completo del defecto óseo generado. No aportan datos acerca de la calidad del tejido óseo neoformado ni del comportamiento del tejido periférico al defecto como se hace en el presente trabajo.

Okazaki y cols⁽¹⁸⁶⁾ elaboraron un compuesto de HA y colágeno mediante mezcla directa de los mismos, posterior secado al aire, y entrecruzamiento mediante irradiación ultravioleta, obteniendo un compuesto de baja porosidad. Presentan datos de experimentación animal con la implantación en el periostio craneal de ratas, apreciándose la formación de tejido óseo de novo a los 21 días.

Kikuchi y cols⁽¹³³⁾ desarrollaron un compuesto de colágeno e HA mediante un método de co-precipitación, empleando para ello colágeno de origen porcino. El compuesto así formado presentaba una estructura similar al hueso natural. Desarrollaron estructuras cilíndricas densas con túneles en su interior, que implantaron en la tibia de tres perros Beagle. En estos animales generaron defectos óseos de 20 mm de longitud, donde aplicaron los cilindros preparados, y estabilizaron mediante un fijador externo tipo Ilizarov. Hicieron un seguimiento radiológico, apreciándose formación ósea a las ocho semanas de implantación. Las muestras histológicas analizadas a este tiempo de seguimiento demostraron la formación de un sistema óseo Haversiano maduro neoformado. Por otra parte, Itoh y cols⁽¹¹⁸⁾ también realizaron un modelo experimental con perros Beagle. Para ello desarrollaron un compuesto denso de colágeno e HA mediante mineralización *in vitro*, para desarrollar vértebras artificiales y realizar una fusión cervical espinal. Los resultados radiológicos e histológicos sugieren la aparición de callo óseo a las 13 semanas de implantación con su compuesto de colágeno e HA.

2.4.- LIGANDOS DE COLÁGENO-HIDROXIAPATITA: PROTEÍNA SPARC

La proteína SPARC u osteonectina posee múltiples funciones en el hueso: se asocia con el crecimiento y proliferación de los osteoblastos así como con la mineralización de la matriz osteoide, regula la génesis de fibrillas de colágeno y el depósito de hidroxiapatita en estas fibrillas, y se une a factores de crecimiento ayudando al desarrollo del ciclo celular^(35, 285). Esta proteína tiene una gran afinidad de unión tanto con el colágeno como con el fosfato cálcico debido a la presencia de dos puentes de unión con el calcio de alta afinidad y otras doce uniones de baja afinidad, formando de esta manera puentes bioquímicos entre la nanoHA y la matriz colágena^(75, 125, 238). La adición de estos enlaces bioquímicos aportan al compuesto objeto de nuestro estudio una estabilidad mayor que la conseguida simplemente mediante el depósito directo de HA sobre una matriz colágena realizado con otros sustitutos, como ha quedado demostrado también por el grupo de investigación de Liao⁽¹⁴⁶⁾, que sin embargo no ha publicado resultados de la implantación en animales.

Otros grupos han buscado un ligando químico que aumentase la adhesión entre el colágeno y la hidroxiapatita, de manera semejante al efecto de la proteína SPARC en este trabajo. Yamasaki y cols⁽²⁸³⁾ han desarrollado un compuesto de apatita cálcica y colágeno, y han incorporado magnesio como ligando de unión. El magnesio desempeña diversas funciones en la homeostasis del cuerpo humano, y facilita la adhesión de la hidroxiapatita con diversas sustancias orgánicas, jugando un importante papel en el control del metabolismo óseo. Realizaron un modelo animal en el fémur de conejos de 24 semanas de vida, generando un defecto de 3.8 mm mediante una trefina, e implantado el compuesto de HA, colágeno y magnesio o el de HA-colágeno sin magnesio. Se utilizó un animal control al que se realizó una perforación sin implantar ningún compuesto. Se trata de un estudio con un planteamiento similar al que se presenta en nuestro trabajo. A las dos semanas de implantación se aprecia neoformación ósea en los animales a los que se implantó el compuesto principal con magnesio. A las cuatro semanas se observó una clara neoformación con ambos compuestos, pero también se aprecia tejido óseo de novo en el animal al que no se implantó nada. Este último dato difiere de los resultados que se presentan en nuestro trabajo, ya que no hemos observado neoformación en las ratas en las que se realizó el fresado sin

implantación ni a los 15 ni a los 60 días, encontrando el defecto generado relleno con tejido de granulación en un primer momento y por médula hematopoyética en el tiempo final. En nuestro trabajo cabría esperar la aparición de osificación en el defecto generado como ocurre en el trabajo de Yamasaki, salvo que consideremos el defecto de 1,5 mm generado en el fémur distal de rata Wistar como un defecto de tamaño crítico, y por tanto sin capacidad de regeneración espontánea. En cualquier caso, el pequeño tamaño muestral de este grupo en el que generamos un defecto sin relleno no presenta diferencias estadísticamente significativas con el resto de grupos de este estudio.

3.- MODELO EXPERIMENTAL UTILIZADO

Para la realización de este trabajo se diseñó un modelo experimental en ratas Wistar en las que se realizó un defecto óseo a nivel del fémur distal, implantando un nuevo biocompuesto de colágeno I/III, nanohidroxiapatita y proteína SPARC. Se establecieron tres grupos control diferentes con los que comparar nuestros resultados, realizándose la implantación ósea de colágeno I/III aislado en uno de ellos, o bien una hidroxiapatita estructural ya comercializada en otro de los grupos. En el tercer grupo control se realizó en defecto óseo que quedó sin rellenar con ningún sustituto.

Dentro de la ingeniería tisular, en el campo de la regeneración ósea se denomina defecto óseo de tamaño crítico (*critical-sized bone defect*, CSBD) al defecto menor posible que no podrá ser reparado espontáneamente y por completo con tejido óseo, siendo sustituido mediante el crecimiento de tejido conectivo. La regeneración de los defectos óseos parece depender de la presencia de células osteoblásticas en el mismo o de su migración hacia él, y de la existencia de factores osteogénicos a una concentración suficiente. Por ello, cuanto más pequeño sea el defecto, es más probable que se den las condiciones ideales para la regeneración ósea. Existe controversia en la literatura acerca del tamaño del defecto óseo que debe generarse en la ingeniería tisular de regeneración ósea en las diferentes especies animales utilizadas en experimentación, así como de la localización anatómica ideal. Uno de los animales de experimentación más utilizados para la regeneración ósea ha sido el conejo, especialmente a nivel de la tibia proximal, generándose defectos de espesor cortical total con forma circular y de 3, 6 y 8 mm de diámetro^(168, 275).

En este trabajo se han empleado ratas Wistar. El corto periodo de gestación, su fácil manejo, su rápido crecimiento y vida media corta, unido a su facilidad de mantenimiento y bajos costes económicos convierten a estos animales en un modelo ideal para este tipo de estudios. Existen diferentes estudios de regeneración ósea que han utilizado ratas de experimentación, considerándose en este animal que el defecto óseo de tamaño crítico es de 5 mm en la región maxilofacial en especímenes adultos, de 5-6 meses de edad^(26, 256). En otras ocasiones el defecto óseo se ha realizado a nivel femoral, generándose para su estudio defectos óseos de diferentes tamaños críticos, como en el estudio de Hogel, donde produjeron defectos óseos femorales de 5 mm que sintetizaron mediante una placa y rellenaron con una combinación de aspirado de médula ósea y BMP-7 recombinante⁽¹⁰⁸⁾; el estudio de Tölle, localizándose el mismo a nivel diafisario bicortical y con un diámetro de 8 mm⁽²⁴¹⁾; o en el reciente trabajo de Nau de este mismo año, con un defecto femoral de tamaño crítico de 10 mm y donde aplicaban una técnica de Masquelet o de membrana inducida, en la que se forma una membrana fibrosa alrededor de un espaciador de polimetilmetacrilato (PMMA) en un primer tiempo quirúrgico, que posteriormente es retirado y sustituido por injerto óseo, manteniendo la membrana neoformada, en un segundo tiempo⁽¹⁷⁸⁾.

En el estudio que se presenta en este trabajo, el defecto generado en el fémur distal de las ratas era de 1.5 mm de diámetro, correspondiente con un Abbocath® de 14Ga. A pesar de generar un defecto óseo de menor diámetro que en otros estudios, se consideró que cumplía con las expectativas de una primera fase de experimentación animal con este nuevo biocompuesto. A diferencia de otras publicaciones, en nuestro trabajo se realizó un abordaje femoral distal intra-articular y un fresado progresivo del canal para posteriormente rellenar este defecto, ya que esto evitaba la necesidad de sintetizar un defecto mayor, obviando de este modo el sesgo que pueda conllevar el aumento de estabilización mecánica. Por otra parte, los resultados observados en el grupo control en el que únicamente se realiza un defecto óseo y fresado del canal femoral sin aportar ningún tipo de sustituto demuestran la ausencia de formación ósea en dicho defecto, pudiendo por tanto considerar el mismo como un defecto óseo de tamaño crítico.

El momento elegido para la eutanasia de los animales y evaluación histológica de resultados a los 15, 30 y 60 días no es casual. En el proceso de incorporación de injertos existe una primera fase temprana, que abarca las primeras 3 semanas, en la cual el hematoma postoperatorio se convierte de manera progresiva en un estroma fibroblástico. En la fase intermedia, a las 4-5 semanas, tiene lugar la remodelación del injerto y la osificación endocondral alrededor del mismo. Por último en la fase tardía, a las 6-10 semanas, se completa el proceso de remodelado óseo con la presencia de una mayor cantidad de médula ósea y la formación de hueso cortical maduro^(22, 129, 257).

La edad de las ratas en el momento de la implantación fue de 8 semanas en todos los casos, empleándose animales de ambos sexos. En nuestro experimento hemos comprobado que el cartílago de crecimiento se encontraba presente a estas edades. Kilborn y cols⁽¹³⁵⁾, en su revisión de la edad a la que se cierran las fisas de los huesos largos en diferentes animales de experimentación, detectaron que no existía correlación entre el cierre fisario y el final del crecimiento. En concreto, en el caso de los roedores pudo apreciarse que la relación entre el crecimiento óseo y la vida media era mucho mayor que en otras especies, persistiendo durante mucho tiempo a pesar de que las ratas se considerasen adultas. No obstante, las ratas Wistar se consideran adultas a las 12 -13 semanas de vida, encontrándose por tanto los animales de nuestro trabajo en una etapa de crecimiento.

4.- DISCUSIÓN DE RESULTADOS.

4.1.- RESULTADOS MACROSCÓPICOS.

Durante el seguimiento postoperatorio no hemos observado signos infecciosos en ningún animal intervenido a pesar de no haber utilizado antibioterapia profiláctica, coincidiendo con los datos descritos en estudios previos⁽⁶⁴⁾. Este resultado coincide con lo expuesto por Carlson y cols⁽⁴³⁾, quienes han presentado un trabajo sobre la capacidad bacteriostática de diferentes materiales utilizados en ingeniería tisular ósea. Han podido demostrar que tanto la HA como el colágeno inhiben el crecimiento bacteriano de los principales patógenos encontrados en el aparato locomotor (*Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus β -hemolíticos* y *Pseudomona aeruginosa*)

en un 49,7% ($p=0,011$) y un 37,5% ($p=0,102$) respectivamente. La combinación de ambos materiales en un mismo compuesto podría potenciar esta capacidad bacteriostática de cada uno de ellos de forma individual. Este dato unido a la adecuada respuesta inmune del huésped y unas condiciones quirúrgicas asépticas pueden ayudar en la prevención de las infecciones del lecho quirúrgico. Por otro lado tampoco hemos apreciado signos que sugieran una posible fractura en el lugar de la implantación ósea, por lo que consideramos que el defecto generado en nuestro trabajo cumplía las características de defecto de tamaño crítico, pero sin perder la estabilidad mecánica.

Al analizar los resultados macroscópicos de las piezas femorales extraídas no se observaron signos de reacción perióstica ni callo óseo, como era de esperar, debido a la localización anatómica intraarticular de nuestro modelo. Por otro lado, en todos los casos fue posible identificar el punto de entrada a nivel del cartílago articular a través del cual se implantó el biomaterial correspondiente. No hemos realizado un estudio histológico con técnicas adecuadas para el cartílago de dicha localización ya que el propósito de nuestro trabajo no era valorar el comportamiento del compuesto sobre lesiones condrales.

4.2.- RESULTADOS HISTOLÓGICOS.

4.2.1.- Muestras no implantadas y subcutáneas

En un primer momento se realizó un estudio histológico de muestras de colágeno I/III y de colágeno I/III, nanoHA y proteína SPARC que no habían sido implantadas, con el objetivo de conocer las características tintoriales y el aspecto que tomarían en el tejido huésped. Al conocer las características del compuesto de estudio podemos valorar el grado de reabsorción del mismo tras la implantación en los animales de experimentación.

Por otro lado, y para valorar tanto el comportamiento biológico como la capacidad osteoinductora del nuevo compuesto y del colágeno I/III aislado, se realizó la implantación subcutánea en las ratas Wistar. La implantación subcutánea es un proceso que se realiza en las fases experimentales iniciales con cualquier biocompuesto y que permite valorar la biocompatibilidad de estos. Analizando los resultados de los dos

compuestos diferentes implantados a nivel subcutáneo, en ambos casos pudo apreciarse la aparición de una reacción a cuerpo extraño para fagocitar el material como cabía esperar, manteniéndose intactas las partículas de nanoHA a los 15 días de implantación. Estos resultados observados en nuestro trabajo coinciden con la respuesta observada en otros estudios, como el de Kashiwazaki y cols⁽¹²⁷⁾, donde realizaron la implantación subcutánea de un compuesto de quitosano y nanohidroxiapatita en ratas Sprague-Dawley. Después de 3 semanas de implantación pudieron apreciar la aparición de una pequeña respuesta inflamatoria, neovascularización y células gigantes multinucleadas alrededor del compuesto, apreciándose una buena capacidad de biodegradación y biocompatibilidad del mismo.

El concepto clásico de osteoinducción implica la formación de hueso heterotópico, es decir en lugares donde fisiológicamente no existe tejido óseo. En la actualidad este término también se aplica a la osificación activada en zonas con hueso preexistente, es decir, inducción ósea ortotópica⁽²¹⁷⁾. El estudio de la osteoinducción se ha realizado mediante la utilización del denominado “*modelo de morfogénesis ósea inducido por matriz*”, que consiste en la implantación subcutánea de matriz ósea desmineralizada en ratas⁽²⁰⁵⁾. A los 3-4 días se ha visto que comienza la proliferación de células mesenquimales análogas a fibroblastos. Entre los 5 y 8 días de implantación se desarrolla tejido cartilaginoso, que comienza a mineralizarse partir del 9º día. Este cartílago mineralizado sufre una invasión vascular en el 10º día y es sustituido progresivamente por hueso reticular, que experimenta un remodelado óseo entre los días 12 y 18. Finalmente en torno al día 21 puede apreciarse un osículo con médula ósea diferenciada. Con ninguno de los dos tipos de implantes subcutáneos utilizados en este trabajo se ha podido comprobar la formación de tejido óseo *de novo* en el modelo animal utilizado. Esta observación puede estar en relación con el tiempo de implantación, ya que sólo transcurrieron 15 días, o con las características del material, que debido a su alta porosidad puede facilitar la infiltración celular y la degradación del mismo.

Du y cols⁽⁶⁴⁾ elaboraron un compuesto de HA y colágeno con baja cristalinidad, sintetizado a partir de una mineralización *in vitro* del colágeno. En este caso, para

valorar la posible capacidad osteoinductora del mismo, lo implantaron en el músculo del muslo de las ratas. Se pudo observar la aparición de tejido conectivo y neovascularización, iniciándose un proceso de biodegradación progresivo mediado por células gigantes multinucleadas en el contexto de una reacción a cuerpo extraño, que fue completo a las 4 semanas de implantación. Estos datos son similares a los observados en nuestro trabajo con los implantes subcutáneos, y confirman la biocompatibilidad del compuesto y la ausencia de capacidad osteoinductora del mismo. No aportan datos de la implantación del sustituto a nivel óseo como en nuestro caso.

4.2.2.- Muestras intraóseas

Para la valoración de los resultados de los implantes intraóseos de este trabajo se ha realizado una evaluación histológica minuciosa mediante microscopía óptica por dos observadores diferentes siguiendo la escala de Heiple^(104, 195), para poder comparar los resultados de los distintos compuestos implantados. Se trata de una escala que valora cuatro parámetros histológicos diferentes: el grado de madurez ósea en la zona del defecto, la presencia y calidad de médula ósea, la continuidad ósea en la zona del defecto generado, y la presencia de formación ósea periférica. Esta escala se elaboró para el análisis de defectos óseos generados a nivel diafisario, y no para defectos intramedulares generados a través de la superficie articular, aunque consideramos que se adapta perfectamente a nuestro modelo.

Cabe destacar que en el grupo control en el que únicamente se realizó un fresado del canal femoral sin implantación de ningún compuesto, no se observó regeneración ósea en los dos tiempos de seguimiento que se establecieron, a los 15 y 60 días. La zona de defecto se encontraba ocupada por tejido de granulación, sin apreciarse neoformación ósea. Este resultado confirma que el defecto que hemos generado puede considerarse como un “defecto de tamaño crítico”, ya que no ha sido capaz de repararse de manera espontánea⁽²¹⁶⁾.

En el grupo control en el que implantamos únicamente colágeno I/III puede observarse la presencia de tejido de granulación y fibras de colágeno en la zona del

defecto generado, situación similar a los casos en los que no se implantó nada. Estos resultados presentan diferencias estadísticamente significativas cuando analizamos el grado de madurez ósea, la persistencia del defecto óseo y la activación de la formación ósea periférica al defecto cuando comparamos con el compuesto de colágeno, nanoHA y SPARC a los 15 días de implantación. Según aumentaron los tiempos de implantación, fueron mejorando todas las características histológicas analizadas, desapareciendo de esta manera la significación estadística con respecto al compuesto de nuestro estudio. Estos resultados parecen confirmar la biocompatibilidad y capacidad de reabsorción del colágeno aislado utilizado como sustituto óseo, así como una menor capacidad de regeneración ósea.

En el último grupo control se utilizó un sustituto óseo de nanohidroxiapatita (Engipore®, Fin-Ceramica, Feanza, Italia). Se trata de un sustituto cerámico disponible en el mercado en la actualidad, con una arquitectura muy similar al tejido óseo natural, y con un tamaño de poro entre 200 y 500 μm y una porosidad de un 90%, lo que facilita la osificación. Se han probado sus efectos beneficiosos sobre células madre así como la expresión de genes relacionados con la diferenciación osteoblástica⁽²²⁴⁾. En nuestro estudio, el tiempo de implantación no influyó en exceso en las características del tejido óseo neoformado, ya que desde los 15 días de implantación pudieron apreciarse islotes aislados de hueso inmaduro y un cierre progresivo del defecto, cercano a la totalidad. No obstante todos los parámetros histológicos valorados (grado de madurez ósea, presencia y calidad de médula ósea, desaparición del defecto óseo generado y formación ósea periférica) presentaban unos valores inferiores en el grupo al que se implantó HA comercial Engipore® al comparar con el grupo de estudio del biomaterial de colágeno I/III, nanoHA y SPARC en los diferentes tiempos de seguimiento, sin encontrarse diferencias estadísticamente significativas. Por último destacar que en este grupo con HA comercial Engipore® no se ha producido la reabsorción completa de la HA ni siquiera en los animales en los que se mantuvo durante 60 días. Como hemos comentado con anterioridad la hidroxiapatita es un biomaterial que activa y facilita la respuesta osteoblástica, pero que presenta una menor capacidad de reabsorción que el colágeno. Este resultado observado en nuestro trabajo contrasta con el estudio de Zhu y cols⁽²⁹⁶⁾, quienes implantaron nanoHA con tres tamaños de poro diferente (50-150 μm , 100-250 μm y 300-500 μm) y con tres tiempos de seguimiento distintos (4, 8 y 12

semanas) en conejos de raza Nueva Zelanda, a nivel del radio distal. Observaron que la capacidad de regeneración ósea era mayor en el grupo de 100-250 μm , con diferencias estadísticamente significativas. En el grupo con tamaño de poro de 300-500 μm , que es el más parecido al que nosotros hemos utilizado, se apreciaba una neoformación ósea elevada, como en nuestro caso. Pero destaca que a las 12 semanas de seguimiento había desaparecido por completo el compuesto implantado, circunstancia que no hemos podido comprobar en nuestro caso.

En el grupo de estudio principal en el que se implantó el compuesto de colágeno I/III, nanoHA y proteína SPARC se ha podido comprobar que el grado de regeneración ósea es elevado en un defecto óseo generado en el fémur distal de ratas Wistar con diferentes tiempos de implantación. El grado de madurez ósea observada fue alto desde los 15 días de implantación, evolucionando hasta hueso maduro compacto a los 60 días. En cuanto a la presencia y calidad de la médula ósea en el defecto, en la primera observación a los 15 días se trataba de la médula con características hematopoyéticas, que fue presentando un aumento del número de adipocitos en las observaciones con mayor tiempo de implantación, sin apreciarse médula ósea amarilla. El defecto óseo generado se encontraba relleno en su práctica totalidad desde los 15 días de implantación, y fue avanzando hasta el cierre completo a los 60 días. Por último, la respuesta del tejido óseo periférico al defecto fue alta desde los 15 días de implantación. En la tabla 30 se describe el tiempo transcurrido hasta la aparición de tejido óseo neoformado en los estudios publicados con diferentes compuestos de colágeno e hidroxiapatita en experimentación animal, y se compara con los resultados de nuestro estudio.

Compuesto	Método de fabricación	Cutivo celular o implantación	Tiempo hasta aparición de tejido neoformado
CO ₃ Apatita-Colágeno (Okazaki ⁽¹⁸⁶⁾)	Mezcla directa, centrifugado, secado al aire. Baja porosidad.	Implantación en el periostio craneal de ratas	21 días (hueso mineralizado).
PCCA-TCP-Colágeno (Du ⁽⁶⁴⁾)	Mineralización in vitro del colágeno. Sustituto poroso en láminas	Implantación en músculo del muslo de ratas.	7 días (tejido conectivo y neovascularización).
HA-Colágeno (Kikuchi ⁽¹³³⁾)	Mineralización in vitro. Cilindros densos con túneles.	Implantación en tibia de perros beagle.	54 días (hueso mineralizado).
HA-Colágeno (Itoh ⁽¹¹⁸⁾)	Mineralización in vitro. Compuesto denso.	Implantación en columna cervical de perros beagle.	13 semanas (inicio de callo óseo).
FGMgCO ₃ Ap-Colágeno (Yamasaki ⁽²⁸³⁾)	Mezclado directo, secado al aire.	Implantación en cráneo de ratas y fémur de conejos.	14-28 días (hueso mineralizado).
HA-Colágeno-Alginato (Sotome ⁽²²⁶⁾)	Mineralización in vitro. Liofilización.	Implantación en fémur de ratas.	14 días (hueso mineralizado).
nHA-Colágeno (Martins ⁽¹⁵⁹⁾)	Mineralización in vitro. Compuesto pastoso.	Implantación en hueso infraorbitario de ratas.	60 días (hueso mineralizado).
CAp-Colágeno (Suh ⁽²³⁰⁾)	Mezcla directa, liofilización. Alta porosidad	Implantación en radio de conejos.	28 días (hueso mineralizado).
Colágeno-nHA-SPARC (HUPHM)	Mezcla directa, liofilización. Alta porosidad. Entrecruzamiento físico y químico.	Implantación en fémur distal de ratas Wistar	15 días

Tabla 30: Comparación de trabajos publicados *in vivo* con diferentes compuestos colágeno-HA, y el compuesto de nuestro trabajo. PCCA-TCP: carbonato-apatita con pobre cristalinidad-fosfato tetra-cálcico (*poorly crystalline carbonate-apatite-tetracalcium phosphate*; FGMgCO₃Ap: cristales de CO₃ apatita graduados funcionalmente con Magnesio (*functionally graded CO₃ apatite crystals containing magnesium*); CAp: carbonato-apatita.

5.- FUTURO DE LA INGENIERÍA TISULAR

Existen diferentes líneas de investigación que abren nuevas perspectivas en el campo de la ingeniería tisular ósea. En los últimos años se están empleando andamios o sustitutos bifásicos para la regeneración de lesiones osteocondrales. Estos sustitutos presentan una capa más superficial formada por colágeno tipo I, y otra capa más profunda formada por una combinación de colágeno tipo I e HA, presentando buenos resultados en el tratamiento de osteonecrosis de rodilla⁽²³⁾ y osteocondritis disecante⁽⁷⁴⁾. Berruto y cols han presentado buenos resultados con la utilización de uno de estos sustitutos bifásico, formado por colágeno tipo I de origen equino en su capa más superficial y una capa profunda compuesta por un 30% de colágeno tipo I y un 70% de nanoHA enriquecida en magnesio (Maiorgen®, Finceramica Feanza Spa, Feanza, Italia)⁽¹³⁸⁾, para el tratamiento de pacientes con osteonecrosis de rodilla. Tras

implantarlo en 11 pacientes con edad inferior a 65 años, se observó un incremento significativo en las escalas de valoración funcional (IKDC y Lysholm Knee Scale) y un descenso significativo en la escala visual analógica del dolor (VAS). En 2 pacientes hubo un deterioro significativo, precisando la implantación de una artroplastia total de rodilla en un plazo de 18 meses. En el modelo experimental que se presenta en nuestro estudio se realizó un defecto osteocondral en el fémur distal de ratas Wistar para la implantación del sustituto óseo objeto de este trabajo. El objetivo del mismo era valorar la regeneración ósea, y se han observado buenos resultados a nivel epifisario y subcondral, no apreciándose restitución del cartílago hialino en la superficie articular.

Recientemente se han publicado varios trabajos en los que se ha utilizado la impresión 3D para la fabricación de sustitutos óseos de fosfato cálcico que se adaptan al defecto óseo que deben regenerar⁽⁵⁾. Básicamente consisten en la fabricación a partir de cemento de fosfato cálcico, estable como una pasta maleable, de estructuras con diferentes geometrías que se adaptan al defecto óseo a restituir, aportando una adecuada estabilidad mecánica y resistencia a la compresión⁽¹⁵⁵⁾. Estas nuevas tecnologías permiten fabricar sustitutos bifásicos o multifásicos de forma rápida, facilitando la incorporación de componentes biológicos como células madre o plasma enriquecido en factores de crecimiento plaquetario (PRP)⁽¹⁵⁶⁾.

El futuro de la ingeniería tisular ósea parece orientado a la consecución de nuevas matrices o biocompuestos fabricados a partir de una combinación de biomateriales y terapia celular. El objetivo de los mismos es conseguir un sustituto óseo ideal que combine unas propiedades mecánicas y facilidad de degradación con un potencial osteogénico que favorezca la regeneración ósea⁽¹⁷⁹⁾. La adición de células madre mesenquimales o de plasma enriquecido en factores de crecimiento plaquetario al compuesto presentado en este trabajo es una posible línea de investigación a desarrollar en los próximos años.

6.- LIMITACIONES

Como conclusión a este trabajo debemos tener en cuenta las siguientes limitaciones:

1.- El reducido tamaño muestral presentado en esta memoria, que se ha visto incrementado por la pérdida de muestras durante el procesado de las mismas por el laboratorio que en un primer momento se iba a encargar de su análisis.

2.- Hubiera resultado interesante poder analizar los resultados de otro grupo control al que se hubiese implantado un compuesto de colágeno I/III y nanoHA, pero sin proteína SPARC actuando como ligando. Probablemente la comparación con este último grupo hubiera aportado información relevante a nuestro estudio acerca del papel desempeñado por la proteína SPARC.

3.- La valoración de los resultados se realiza en base a un estudio histológico, sin aportar datos cuantitativos. Se podía haber realizado un estudio histomorfométrico bidimensional, y haber obtenido datos cuantitativos al valorar de forma objetiva la fracción de tejido óseo neoformado en las cavidades óseas generadas. Para ello se requiere un *software* específico del que se carecía en este estudio^(3, 4).

4.- La localización anatómica y la edad de los animales elegidos, ya que la presencia de fisuras abiertas confirma que se trata de animales con un hueso inmaduro, lo que podría distorsionar los resultados. Los animales intervenidos tenían 8 semanas de vida, alcanzando las ratas Wistar su madurez esquelética a las 12-13 semanas. La capacidad de regeneración ósea a estas tempranas edades es superior a la de individuos adultos. Por otro lado, el hecho de atravesar el cartílago articular para generar nuestro defecto óseo puede variar los resultados con respecto al mismo defecto óseo generado a nivel diafisario, donde el periostio puede jugar un importante papel. No obstante hemos encontrado diferencias en las muestras entre los diferentes grupos de estudio.

5.- Se trata de un estudio preliminar, a partir del cual desarrollar trabajos posteriores para corroborar los resultados obtenidos en esta primera fase. La utilización de grupos más amplios, en animales filogenéticamente superiores y más semejantes al ser humano, así como la utilización de este compuesto como transportador de células progenitoras o factores de crecimiento pueden arrojar resultados esperanzadores en un campo en constante evolución y que sigue planteando en la actualidad un reto en la cirugía ortopédica y traumatológica.

VI.- CONCLUSIONES

Tras el análisis de los resultados obtenidos en este trabajo, se puede considerar que el modelo experimental de implantación de un sustituto óseo formado por colágeno I/III, nanoHA y proteína SPARC en el femur distal de ratas Wistar y su comparación con tres grupos control diferentes es adecuado para el análisis de neoformación ósea. Por otro lado, la aplicación subcutánea del compuesto permite valorar su biocompatibilidad y capacidad osteoinductora.

En base a lo observado podemos extraer las siguientes conclusiones:

1.- La utilización de un compuesto de colágeno I/III, nanoHA y proteína SPARC como sustituto óseo favorece una mayor neoformación ósea desde los 15 días de implantación en comparación con los tres grupos control. Esta neoformación aumenta con el tiempo de seguimiento, apreciándose hueso maduro a los 60 días de implantación.

2.- También se ha apreciado neoformación en los grupos con colágeno I/III aislada e HA comercial, aunque en menor cuantía que con el compuesto de estudio. En todos los casos la neoformación aumenta con el tiempo de implantación.

3.- En el grupo de solo fresado no se ha apreciado neoformación ósea. Un defecto de 1,5 mm de diámetro a nivel de fémur distal en ratas Wistar puede considerarse como un “defecto de tamaño crítico”, ya que no ha sido capaz de repararse de manera espontánea.

4.- No se ha observado neoformación ósea cuando se ha implantado el sustituto de colágeno I/III, nanoHA y proteína SPARC a nivel subcutáneo, descartándose la capacidad osteoinductora del mismo.

VII.- RESUMEN

1.- INTRODUCCIÓN.

Anualmente más de 1.100.000 procedimientos quirúrgicos necesitan la resección parcial de hueso y la utilización de injerto óseo. El autoinjerto óseo sigue considerándose hoy en día como el “patrón oro”, pero su obtención asocia importantes inconvenientes debido a la morbilidad y limitada cantidad obtenida. El aloinjerto de cadáver ofrece la ventaja teórica de obtener mayores cantidades, pero con el riesgo potencial de transmisión de enfermedades y respuesta inmunológica en el huésped.

La ingeniería tisular ósea ha realizado en las últimas décadas importantes avances en la búsqueda de un sustituto óseo ideal que pueda reunir las ventajas del autoinjerto y evitar sus complicaciones. Los biocompuestos formados por la combinación de colágeno y nanohidroxiapatita (nanoHA) han centrado la atención de los investigadores en este tiempo, ya que se ha demostrado que la formulación nanométrica incrementa la neoformación ósea. La búsqueda de un ligando que evite la dispersión de las partículas de nanoHA en estos compuestos es un reto pendiente de resolver.

2.- HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.

Nuestro objetivo es determinar si la utilización de un nuevo compuesto formado por colágeno I/III, nanoHA y proteína SPARC u osteonectina, que actúa como ligando químico, mejora la neoformación ósea a nivel histológico. Como objetivo secundario nos planteamos valorar la biocompatibilidad y capacidad osteoinductora de este nuevo compuesto.

3.- MATERIAL Y MÉTODOS

Se diseñó un estudio experimental en 43 ratas Wistar de ocho semanas de vida, realizándose implantes subcutáneos del compuesto de colágeno, nanoHA y proteína SPARC, o de colágeno I/III aislado, en 14 animales. Los 29 animales restantes fueron aleatorizados en cuatro grupos de estudio, y se les generó un defecto óseo de 1,5 mm a nivel del fémur distal para ser rellenado posteriormente por un sustituto diferente y con

distinto tiempo de seguimiento, según el siguiente esquema: I) Grupo estudio: colágeno I/III, nanoHA y SPARC (15 días, 6 muestras; 30 días, 6 muestras; 60 días, 6 muestras); II) Grupo control sólo fresado (15 días, 2 muestras; 60 días, 2 muestras); III) Grupo control sólo colágeno I/III (15 días, 6 muestras; 30 días, 6 muestras; 60 días, 6 muestras); IV) Grupo control HA comercial (15 días, 6 muestras; 30 días, 6 muestras; 60 días, 6 muestras). Se evaluaron los resultados clínicos, macroscópicos y mediante estudios histológicos con los diferentes tiempos de seguimiento en cada caso.

4.- RESULTADOS

La cantidad y calidad del tejido óseo neoformado en el grupo de estudio en el que se implantó colágeno I/III, nanoHA y proteína SPARC fue mayor que en los restantes grupos y en los diferentes tiempos de seguimiento, presentando diferencias estadísticamente significativas al comparar con el grupo de sólo colágeno I/III a los 15 días ($p=0,005$) y 60 días ($p=0,008$) de seguimiento. También se han apreciado diferencias al comparar con el grupo de HA comercial, sin llegar a la significación estadística. En el grupo en el que sólo se generó un defecto óseo, sin aportar ningún sustituto, no se apreció neoformación ósea. En todos los casos pudo observarse la persistencia del defecto generado a nivel del cartílago articular. No hemos registrado ningún caso de infección. No se ha observado neoformación ósea en los animales en los que se realizó el implante subcutáneo del biocompuesto de colágeno I/III, nanohidroxiapatita y proteína SPARC.

5.- CONCLUSIONES

La utilización de un nuevo biocompuesto de colágeno I/III, nanoHA y proteína SPARC como sustituto óseo en un modelo experimental con ratas Wistar favorece y acelera la neoformación ósea desde los 15 días de implantación del mismo.

El defecto óseo generado de 1,5 mm a nivel del fémur distal puede considerarse como un “defecto de tamaño crítico” ya que no hemos apreciado neoformación ósea en los animales en lo que no se implantó ningún sustituto.

No hemos apreciado neoformación ósea en los animales en los que se implantó el sustituto de colágeno I/III, nanoHA y proteína SPARC a nivel subcutáneo, descartándose de este modo la capacidad osteoinductora del mismo.

VIII.-BIBLIOGRAFÍA

1. Ministerio de la Presidencia. Real Decreto 53/2013. Boletín Oficial del Estado. 2013. p. 11396-421.
2. Abjornson C LJ. Demineralized bone matrix and synthetic bone graft substitutes. In: Friedlaender GE MH, Goldberg VM, editor. Bone grafts and bone graft substitutes. Rosemont, IL: American Academy of Orthopaedic Surgeons; 2006. p. 9-20.
3. Aghaloo TL, Moy PK, Freymiller EG. Evaluation of platelet-rich plasma in combination with anorganic bovine bone in the rabbit cranium: a pilot study. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2004 Jan-Feb;19(1):59-65.
4. Aghaloo TL, Moy PK, Freymiller EG. Investigation of platelet-rich plasma in rabbit cranial defects: A pilot study. *J Oral Maxillofac Surg*. 2002 Oct;60(10):1176-81.
5. Ahlfeld T, Akkineni AR, Forster Y, Kohler T, Knaack S, Gelinsky M, et al. Design and Fabrication of Complex Scaffolds for Bone Defect Healing: Combined 3D Plotting of a Calcium Phosphate Cement and a Growth Factor-Loaded Hydrogel. *Ann Biomed Eng*. 2017 Jan;45(1):224-36.
6. Aigner T, Stove J. Collagens--major component of the physiological cartilage matrix, major target of cartilage degeneration, major tool in cartilage repair. *Adv Drug Deliv Rev*. 2003 Nov 28;55(12):1569-93.
7. Aizawa M, Ueno H, Itatani K, Okada I. Syntheses of calcium-deficient apatite fibers by a homogeneous precipitation method and their characterizations. *J Eur Ceram Soc*. 2006;26(4):501-7.
8. Alberts B, Bray D, Johnson A, Lewis J, Raif M, Robert K, editors. *Introducción a la biología celular*. Barcelona: Ediciones Omega, S.A.; 1999.
9. Alekseeva T, Hadjipanayi E, Abou Neel EA, Brown RA. Engineering stable topography in dense bio-mimetic 3D collagen scaffolds. *Eur Cell Mater*. 2012 Jan 29;23:28-40.
10. Alhag M, Farrell E, Toner M, Claffey N, Lee TC, O'Brien F. Evaluation of early healing events around mesenchymal stem cell-seeded collagen-glycosaminoglycan scaffold. An experimental study in Wistar rats. *Oral Maxillofac Surg*. 2011 Mar;15(1):31-9.
11. Amini AR, Laurencin CT, Nukavarapu SP. Bone tissue engineering: recent advances and challenges. *Crit Rev Biomed Eng*. 2012;40(5):363-408.
12. Anderson HC, Sipe JB, Hessle L, Dhanyamraju R, Atti E, Camacho NP, et al. Impaired calcification around matrix vesicles of growth plate and bone in alkaline phosphatase-deficient mice. *Am J Pathol*. 2004 Mar;164(3):841-7.
13. Anderson J. Host reactions to biomaterial and their evaluation. In: Ratner B, editor. *Biomaterials science: An introduction to materials in medicine*. Academic Press San Diego, CA1996. p. 127-46.
14. Anh E, Gleason N, Nakahira A, Ying J. Nanostructure processing of hydroxyapatite-based bioceramics. *Nano Letters*. 2001;1:149-53.

15. Ashammakhi N, Ndreu A, Yang Y, Ylikauppila H, Nikkola L, Hasirci V. Tissue engineering: a new take-off using nanofiber-based scaffolds. *J Craniofac Surg*. 2007 Jan;18(1):3-17.
16. Aubin J. Osteogenic cell differentiation. In: Davies J, editor. *Bone Biology*. Toronto 2000. p. 19-30.
17. Autores V. *Diccionario de la Real Academia Española de la Lengua*. Madrid 2013.
18. Bae HW, Zhao L, Kanim LE, Wong P, Delamarter RB, Dawson EG. Intervariability and intravariability of bone morphogenetic proteins in commercially available demineralized bone matrix products. *Spine (Phila Pa 1976)*. 2006 May 20;31(12):1299-306; discussion 307-8.
19. Barrere F, van BC, de GK, Layrolle P. Nucleation of biomimetic Ca-P coatings on ti6Al4V from a SBF x 5 solution: influence of magnesium. *Biomaterials*. 2002 May;23(10):2211-20.
20. Barrere F, van Blitterswijk CA, de Groot K, Layrolle P. Influence of ionic strength and carbonate on the Ca-P coating formation from SBFx5 solution. *Biomaterials*. 2002 May;23(9):1921-30.
21. Bateman J LD, Ramshaw J. Collagen superfamily. In: W. C, editor. *Extracellular Matrix*. Melbourne.: Harwood Academic Press.; 1996. p. 22-67.
22. Bauer TW, Muschler GF. Bone graft materials. An overview of the basic science. *Clin Orthop Relat Res*. 2000 Feb(371):10-27.
23. Berruto M, Ferrua P, Uboldi F, Pasqualotto S, Ferrara F, Carimati G, et al. Can a biomimetic osteochondral scaffold be a reliable alternative to prosthetic surgery in treating late-stage SPONK? *Knee*. 2016 Dec;23(6):936-41.
24. Billote W. Chapter 2: ceramic biomaterials. In: Park J, editor. *Biomaterials Principles and applications*. Boca Ratón, FL: CRC Press; 2003. p. 21-54.
25. Bolognesi MP, Pietrobon R, Clifford PE, Vail TP. Comparison of a hydroxyapatite-coated sleeve and a porous-coated sleeve with a modular revision hip stem. A prospective, randomized study. *J Bone Joint Surg Am*. 2004 Dec;86-A(12):2720-5.
26. Bosch C, Melsen B, Vargervik K. Importance of the critical-size bone defect in testing bone-regenerating materials. *J Craniofac Surg*. 1998 Jul;9(4):310-6.
27. Bose S, Saha S. Synthesis and characterization of hydroxyapatite nanopowders by emulsion technique. *Chemistry Materials*. 2003;15:4464-9.
28. Bostrom M LJ, Tomin E, Browne M, Berberian W, Turek T, Smith J, Wozney J, Schildhauer T. Use of bone morphogenetic protein-2 in the rabbit ulnar nonunion model. *Clin Orthop Relat Res*. 1996;327:272-82.

29. Bouyer E, Gitzhofer F, Boulos MI. Morphological study of hydroxyapatite nanocrystal suspension. *J Mater Sci Mater Med*. 2000 Aug;11(8):523-31.
30. Boyce T, Edwards J, Scarborough N. Allograft bone. The influence of processing on safety and performance. *Orthop Clin North Am*. 1999 Oct;30(4):571-81.
31. Boyle C, Kim IY. Three-dimensional micro-level computational study of Wolff's law via trabecular bone remodeling in the human proximal femur using design space topology optimization. *J Biomech*. 2011 Mar 15;44(5):935-42.
32. Boyle WJ, Simonet WS, Lacey DL. Osteoclast differentiation and activation. *Nature*. 2003 May 15;423(6937):337-42.
33. Bradt J, Mertig M, Teresiak A, Pompe W. Biomimetic mineralization of collagen by combined fibril assembly and calcium phosphate formation. *Chem Mat*. 1999;11:2694-701.
34. Brekken RA, Sage EH. SPARC, a matricellular protein: at the crossroads of cell-matrix. *Matrix Biol*. 2000 Dec;19(7):569-80.
35. Brekken RA, Sage EH. SPARC, a matricellular protein: at the crossroads of cell-matrix communication. *Matrix Biol*. 2001 Jan;19(8):816-27.
36. Brennan JS. Stata companion. *Methods Mol Biol*. 2010;620:599-626.
37. Brodsky B, Persikov AV. Molecular structure of the collagen triple helix. *Adv Protein Chem*. 2005;70:301-39.
38. Buck BE, Malinin TI. Human bone and tissue allografts. Preparation and safety. *Clin Orthop Relat Res*. 1994 Jun(303):8-17.
39. Burg KJ, Porter S, Kellam JF. Biomaterial developments for bone tissue engineering. *Biomaterials*. 2000 Dec;21(23):2347-59.
40. Camazzola D, Hammond T, Gandhi R, Davey JR. A randomized trial of hydroxyapatite-coated femoral stems in total hip arthroplasty: a 13-year follow-up. *J Arthroplasty*. 2009 Jan;24(1):33-7.
41. Cammisa FP, Jr., Lowery G, Garfin SR, Geisler FH, Klara PM, McGuire RA, et al. Two-year fusion rate equivalency between Grafton DBM gel and autograft in posterolateral spine fusion: a prospective controlled trial employing a side-by-side comparison in the same patient. *Spine (Phila Pa 1976)*. 2004 Mar 15;29(6):660-6.
42. Canalis E, McCarthy TL, Centrella M. The role of growth factors in skeletal remodeling. *Endocrinol Metab Clin North Am*. 1989 Dec;18(4):903-18.
43. Carlson GA, Dragoo JL, Samimi B, Bruckner DA, Bernard GW, Hedrick M, et al. Bacteriostatic properties of biomatrices against common orthopaedic pathogens. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004 Aug 20;321(2):472-8.
44. Carter JD, Swearingen AB, Chaput CD, Rahm MD. Clinical and radiographic assessment of transforaminal lumbar interbody fusion using HEALOS collagen-

hydroxyapatite sponge with autologous bone marrow aspirate. *Spine J.* 2009 Jun;9(6):434-8.

45. CDC. Transmission of HIV through bone transplantation: case report and public health recommendations. Center for Disease Control. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 1988 Oct 07;37(39):597-9.

46. Coathup MJ, Blunn GW, Flynn N, Williams C, Thomas NP. A comparison of bone remodelling around hydroxyapatite-coated, porous-coated and grit-blasted hip replacements retrieved at post-mortem. *J Bone Joint Surg Br.* 2001 Jan;83(1):118-23.

47. Cook SD, Baffes GC, Wolfe MW, Sampath TK, Rueger DC, Whitecloud TS, 3rd. The effect of recombinant human osteogenic protein-1 on healing of large segmental bone defects. *J Bone Joint Surg Am.* 1994 Jun;76(6):827-38.

48. Cordero-Ampuero J. Biomateriales y sustitutos óseos. . In: Forriol-Campos F, editor. *Manual de cirugía ortopédica y traumatología Segunda ed.* Madrid.: Editorial Médica Panamericana. ; 2010. p. 35-40.

49. Currey J. Physical characteristics affecting the tensile failure properties of compact bone. *J Biomech.* 1990;23:837-44.

50. Challa VS, Mali S, Misra RD. Reduced toxicity and superior cellular response of preosteoblasts to Ti-6Al-7Nb alloy and comparison with Ti-6Al-4V. *J Biomed Mater Res A.* 2013 Jul;101(7):2083-9.

51. Chevallay B, Herbage D. Collagen-based biomaterials as 3D scaffold for cell cultures: applications for tissue engineering and gene therapy. *Med Biol Eng Comput.* 2000 Mar;38(2):211-8.

52. Chu C LP, Dong Y, Go D. Influences of citric acid as a chelating reagent on the characteristics of nanophase hydroxyapatite powders fabricated by a sol-gel method. *Journal of Material Science Letters.* 2002;21:1793-5.

53. Chvapil M. Collagen sponge: theory and practice of medical applications. *J Biomed Mater Res.* 1977 Sep;11(5):721-41.

54. Damink L, Dijkstra P, Vanluyn M, Vanwahem P, Nieuwenhuis P, Feijen J. Glutaraldehyde as a cross-linking agent for collagen-based biomaterials. . *J Mater Sci Mater Med.* 1995;6:460-72.

55. Dawson JI, Wahl DA, Lanham SA, Kanczler JM, Czernuszka JT, Oreffo RO. Development of specific collagen scaffolds to support the osteogenic and chondrogenic differentiation of human bone marrow stromal cells. *Biomaterials.* 2008 Jul;29(21):3105-16.

56. de Bruijn JD, van Blitterswijk CA, Davies JE. Initial bone matrix formation at the hydroxyapatite interface in vivo. *J Biomed Mater Res.* 1995 Jan;29(1):89-99.

57. Dee K PD, Bizios R. Wound Healing. In: Hoboken JWSI, editor. *An introduction to tissue-biomaterial interactions.* New Jersey 2002. p. 165-214.

58. Delany AM, Amling M, Priemel M, Howe C, Baron R, Canalis E. Osteopenia and decreased bone formation in osteonectin-deficient mice. *J Clin Invest.* 2000 Apr;105(7):915-23.
59. Dembe AE, Partridge JS, Geist LC. Statistical software applications used in health services research: analysis of published studies in the U.S. *BMC Health Serv Res.* 2011 Oct 06;11:252.
60. Doillon CJ, Whyne CF, Brandwein S, Silver FH. Collagen-based wound dressings: control of the pore structure and morphology. *J Biomed Mater Res.* 1986 Oct;20(8):1219-28.
61. Dorozhkin SV. Amorphous calcium (ortho)phosphates. *Acta Biomater.* 2010 Dec;6(12):4457-75.
62. Dorozhkin SV. Nanosized and nanocrystalline calcium orthophosphates. *Acta Biomater.* 2010 Mar;6(3):715-34.
63. Drosos GI, Touzopoulos P, Ververidis A, Tilkeridis K, Kazakos K. Use of demineralized bone matrix in the extremities. *World J Orthop.* 2015 Mar 18;6(2):269-77.
64. Du C, Cui FZ, Zhang W, Feng QL, Zhu XD, de Groot K. Formation of calcium phosphate/collagen composites through mineralization of collagen matrix. *J Biomed Mater Res.* 2000 Jun 15;50(4):518-27.
65. Dua A, Kiran K, Malhotra R, Bhan S. Acetabular reconstruction using fresh frozen bone allograft. *Hip Int.* 2010 Apr-Jun;20(2):143-9.
66. Effah Kaufmann EA, Ducheyne P, Shapiro IM. Evaluation of osteoblast response to porous bioactive glass (45S5) substrates by RT-PCR analysis. *Tissue Eng.* 2000 Feb;6(1):19-28.
67. Faraj KA, van Kuppevelt TH, Daamen WF. Construction of collagen scaffolds that mimic the three-dimensional architecture of specific tissues. *Tissue Eng.* 2007 Oct;13(10):2387-94.
68. Farrell E, O'Brien FJ, Doyle P, Fischer J, Yannas I, Harley BA, et al. A collagen-glycosaminoglycan scaffold supports adult rat mesenchymal stem cell differentiation along osteogenic and chondrogenic routes. *Tissue Eng.* 2006 Mar;12(3):459-68.
69. Favus M. Primer on the metabolic bone diseases and disorders of mineral metabolism. 6 th ed: American Society for Bone and Mineral Research; 2007.
70. Fawcett D, editor. *Tratado de Histología.* 1 ed. Madrid: Interamericana; 1995.
71. Fernández-Bisbal P. Fisiología del tejido óseo. Necrosis óseas y síndromes afines. . In: Delgado-Marinez A, editor. *Cirugía Ortopédica y Traumatología Segunda ed.* Madrid.: Editorial Médica Panamericana.; 2012.

72. Ferrández-Portal L, Gómez-Castresana F. El hueso y el cartílago de crecimiento In: Forriol-Campos F, editor. *Manual de Cirugía Ortopédica y Traumatología* Sociedad Española de Cirugía Ortopédica y Traumatología. Segunda ed. Madrid: Editorial Médica Panamericana; 2010.
73. Ferreira AM, Gentile P, Chiono V, Ciardelli G. Collagen for bone tissue regeneration. *Acta Biomater*. 2012 Sep;8(9):3191-200.
74. Filardo G, Kon E, Di Martino A, Busacca M, Altadonna G, Marcacci M. Treatment of knee osteochondritis dissecans with a cell-free biomimetic osteochondral scaffold: clinical and imaging evaluation at 2-year follow-up. *Am J Sports Med*. 2013 Aug;41(8):1786-93.
75. Fisher LW, Robey PG, Tuross N, Otsuka AS, Tepen DA, Esch FS, et al. The Mr 24,000 phosphoprotein from developing bone is the NH₂-terminal propeptide of the alpha 1 chain of type I collagen. *J Biol Chem*. 1987 Oct 5;262(28):13457-63.
76. Fleischmajer R, MacDonald ED, Perlsh JS, Burgeson RE, Fisher LW. Dermal collagen fibrils are hybrids of type I and type III collagen molecules. *J Struct Biol*. 1990 Oct-Dec;105(1-3):162-9.
77. Forriol-Campos F. El hueso como tejido y como órgano. Fundación SECOT Ciencias básicas aplicadas a la cirugía ortopédica. Madrid: Drug Farma; 1999. p. 83-92.
78. Forriol E. Combinación de sustitutos óseos osteoconductores, osteoinductores y componentes celulares. Ingeniería del tejido óseo. Injertos, sustitutos óseos y materiales en la cirugía reconstructiva del aparato locomotor. Salamanca: Fundación SECOT; 2005. p. 177-87.
79. Fox K, Tran PA, Tran N. Recent advances in research applications of nanophase hydroxyapatite. *Chemphyschem*. 2012 Jul 16;13(10):2495-506.
80. Friedlaender GE. Bone grafts. The basic science rationale for clinical applications. *J Bone Joint Surg Am*. 1987 Jun;69(5):786-90.
81. Friedlaender GE MH, Goldberg VM, editor. *Bone grafts and bone graft substitutes*. Rosemont, Illinois: American Academy of Orthopaedic Surgeons; 2006.
82. Friess W. Collagen--biomaterial for drug delivery. *Eur J Pharm Biopharm*. 1998 Mar;45(2):113-36.
83. Fujishiro Y, Fujimoto A, Sato T, Okuwaki A. Coating of hydroxyapatite on titanium plates using thermal dissociation of calcium-EDTA chelate complex in phosphate solutions under hydrothermal conditions. *J Colloid Interface Sci*. 1995;173(1):119-27.
84. Gandhi R, Davey JR, Mahomed NN. Hydroxyapatite coated femoral stems in primary total hip arthroplasty: a meta-analysis. *J Arthroplasty*. 2009 Jan;24(1):38-42.
85. Gehron R. Normal bone formation: structure. In: Friedlander G LJ, editor. *Bone Formation and Repair*. Rosemont, IL: American Academy of Orthopaedic Surgeons (AAOS) Symposium; 1994. p. 3-12.

86. Gelse K, Poschl E, Aigner T. Collagens--structure, function, and biosynthesis. *Adv Drug Deliv Rev.* 2003 Nov 28;55(12):1531-46.
87. Gleeson JP, Plunkett NA, O'Brien FJ. Addition of hydroxyapatite improves stiffness, interconnectivity and osteogenic potential of a highly porous collagen-based scaffold for bone tissue regeneration. *Eur Cell Mater.* 2010 Oct 04;20:218-30.
88. Glimcher MJ. Mechanism of calcification: role of collagen fibrils and collagen-phosphoprotein complexes in vitro and in vivo. *Anat Rec.* 1989 Jun;224(2):139-53.
89. Glowacki J MS. Collagen scaffolds for tissue engineering. *Biopolymers.* 2007;89(5):338-44.
90. Glowacki J RC, Glimcher MJ, Cox KA, Lian J. A role for osteocalcin in osteoclast differentiation. *J Cell Biochem.* 1991;45 (3):292-302.
91. Goldberg VM, Stevenson S. Natural history of autografts and allografts. *Clin Orthop Relat Res.* 1987 Dec(225):7-16.
92. Goldner J. A modification of the masson trichrome technique for routine laboratory purposes. *Am J Pathol.* 1938 Mar;14(2):237-43.
93. Gorham SD, Light ND, Diamond AM, Willins MJ, Bailey AJ, Wess TJ, et al. Effect of chemical modifications on the susceptibility of collagen to proteolysis. II. Dehydrothermal crosslinking. *Int J Biol Macromol.* 1992 Jun;14(3):129-38.
94. Greenhalgh D. The role of monocytes/macrophages in wound healing. In: J. Robinson and G. Babcock E, editor. *Phagocyte function: A guide for research and clinical evaluation*: Wiley-Liss; 1998. p. 349-57.
95. Grimandi G, Weiss P, Millot F, Daculsi G. In vitro evaluation of a new injectable calcium phosphate material. *J Biomed Mater Res.* 1998 Mar 15;39(4):660-6.
96. Guo X, Gough JE, Xiao P, Liu J, Shen Z. Fabrication of nanostructured hydroxyapatite and analysis of human osteoblastic cellular response. *J Biomed Mater Res A.* 2007 Sep 15;82(4):1022-32.
97. Haddow D JP, Van Noort R. Sol-gel derived calcium phosphate coatings for biomedical applications. . *Journal of Sol-Gel Science and Technology.* 1998;13:261-5.
98. Hak DJ. The use of osteoconductive bone graft substitutes in orthopaedic trauma. *J Am Acad Orthop Surg.* 2007 Sep;15(9):525-36.
99. Hall BK. Cellular interactions during cartilage and bone development. *J Craniofac Genet Dev Biol.* 1991 Oct-Dec;11(4):238-50.
100. Hamadouche M, Sedel L. Ceramics in orthopaedics. *J Bone Joint Surg Br.* 2000 Nov;82(8):1095-9.
101. Hartgerink JD, Beniash E, Stupp SI. Self-assembly and mineralization of peptide-amphiphile nanofibers. *Science.* 2001 Nov 23;294(5547):1684-8.

102. Harvey EJ, Henderson JE, Vengallatore ST. Nanotechnology and bone healing. *J Orthop Trauma*. 2010 Mar;24 Suppl 1:S25-30.
103. Hay ED. Extracellular matrix. *J Cell Biol*. 1981 Dec;91(3 Pt 2):205s-23s.
104. Heiple KG, Chase SW, Herndon CH. A Comparative Study of the Healing Process Following Different Types of Bone Transplantation. *J Bone Joint Surg Am*. 1963 Dec;45:1593-616.
105. Hernigou P, Poignard A, Beaujean F, Rouard H. Percutaneous autologous bone-marrow grafting for nonunions. Influence of the number and concentration of progenitor cells. *J Bone Joint Surg Am*. 2005 Jul;87(7):1430-7.
106. Heughebaert J ZS, Nancollas G. The growth of nonstoichiometric apatite from aqueous solution at 37°C. Methodology and growth at pH7.4. *Journal of Colloids Interface Science*. 1990;135:20-32.
107. Higashi S, Yamamuro T, Nakamura T, Ikada Y, Hyon SH, Jamshidi K. Polymer-hydroxyapatite composites for biodegradable bone fillers. *Biomaterials*. 1986 May;7(3):183-7.
108. Hogel F, Hoffmann S, Hungerer S, Fleischacker E, Ullmann T, Betz OB, et al. Bone healing of critical size defects of the rat femur after the application of bone marrow aspirate and two different rh-BMP7 concentrations. *Eur J Trauma Emerg Surg*. 2015 Oct;41(5):557-63.
109. Holtrop M. Chapter 1: Light and electron microscope structure of bone-forming cells. In: Hall B, editor. *Bone: The osteoblasts and osteocytes*. New Jersey: The Telford Press; 1990. p. 1-39.
110. Hollinger J, Wong ME. The integrated processes of hard tissue regeneration with special emphasis on fracture healing. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 1996 Dec;82(6):594-606.
111. Hollister SJ, Maddox RD, Taboas JM. Optimal design and fabrication of scaffolds to mimic tissue properties and satisfy biological constraints. *Biomaterials*. 2002 Oct;23(20):4095-103.
112. Hooper G. Bone as a tissue. In: Hughes S, editor. *Orthopaedics The principles and practice of musculoskeletal surgery and fractures*. London: Churchill Livingstone; 1987. p. 1-14.
113. Hsu FY, Chueh SC, Wang YJ. Microspheres of hydroxyapatite/reconstituted collagen as supports for osteoblast cell growth. *Biomaterials*. 1999 Oct;20(20):1931-6.
114. Huang H, Jiang C, Feng Z, Jiang X. Comparing the process of creeping substitution between allograft bone and local bone grafting in lumbar interbody fusion. *Eur Spine J*. 2014 Oct;23(10):2068-74.
115. Hutmacher DW, Sittlinger M, Risbud MV. Scaffold-based tissue engineering: rationale for computer-aided design and solid free-form fabrication systems. *Trends Biotechnol*. 2004 Jul;22(7):354-62.

116. Hyakuna K, Yamamuro T, Kotoura Y, Oka M, Nakamura T, Kitsugi T, et al. Surface reactions of calcium phosphate ceramics to various solutions. *J Biomed Mater Res*. 1990 Apr;24(4):471-88.
117. Ikada Y. Challenges in tissue engineering. *J R Soc Interface*. 2006 Oct 22;3(10):589-601.
118. Itoh S, Kikuchi M, Koyama Y, Takakuda K, Shinomiya K, Tanaka J. Development of an artificial vertebral body using a novel biomaterial, hydroxyapatite/collagen composite. *Biomaterials*. 2002 Oct;23(19):3919-26.
119. Janeway CA, Jr. How the immune system protects the host from infection. *Microbes Infect*. 2001 Nov;3(13):1167-71.
120. Janicki P, Schmidmaier G. What should be the characteristics of the ideal bone graft substitute? Combining scaffolds with growth factors and/or stem cells. *Injury*. 2011 Sep;42 Suppl 2:S77-81.
121. Jinawath S, Pongkao D, Yoshimura M. Hydrothermal synthesis of hydroxyapatite from natural source. *J Mater Sci Mater Med*. 2002 May;13(5):491-4.
122. Johnson AJW, Herschler BA. A review of the mechanical behavior of CaP and CaP/polymer composites for applications in bone replacement and repair. *Acta Biomater*. 2011 Jan;7(1):16-30.
123. Jokanovic V, Izvonar D, Dramicanin MD, Jokanovic B, Zivojinovic V, Markovic D, et al. Hydrothermal synthesis and nanostructure of carbonated calcium hydroxyapatite. *J Mater Sci Mater Med*. 2006 Jun;17(6):539-46.
124. Jonasova L, Muller FA, Helebrant A, Strnad J, Greil P. Biomimetic apatite formation on chemically treated titanium. *Biomaterials*. 2004 Mar-Apr;25(7-8):1187-94.
125. Jundt G, Berghauer KH, Termine JD, Schulz A. Osteonectin--a differentiation marker of bone cells. *Cell Tissue Res*. 1987 May;248(2):409-15.
126. Karageorgiou V, Kaplan D. Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis. *Biomaterials*. 2005 Sep;26(27):5474-91.
127. Kashiwazaki H, Kishiya Y, Matsuda A, Yamaguchi K, Iizuka T, Tanaka J, et al. Fabrication of porous chitosan/hydroxyapatite nanocomposites: their mechanical and biological properties. *Biomed Mater Eng*. 2009;19(2-3):133-40.
128. Katja H ME. Human anatomy and physiology. In: Cummings PB, editor. 7 th ed. San Francisco 2007. p. 1249.
129. Khan SN, Cammisa FP, Jr., Sandhu HS, Diwan AD, Girardi FP, Lane JM. The biology of bone grafting. *J Am Acad Orthop Surg*. 2005 Jan-Feb;13(1):77-86.
130. Khan Y, Yaszemski MJ, Mikos AG, Laurencin CT. Tissue engineering of bone: material and matrix considerations. *J Bone Joint Surg Am*. 2008 Feb;90 Suppl 1:36-42.

131. Khor KA, Gu YW, Pan D, Cheang P. Microstructure and mechanical properties of plasma sprayed HA/YSZ/Ti-6Al-4V composite coatings. *Biomaterials*. 2004 Aug;25(18):4009-17.
132. Kickelbick G. Concepts for the incorporation of inorganic building blocks into organic polymers on a nanoscale. *Prog Polym Sci*. 2003;28(1):83-114.
133. Kikuchi M, Itoh S, Ichinose S, Shinomiya K, Tanaka J. Self-organization mechanism in a bone-like hydroxyapatite/collagen nanocomposite synthesized in vitro and its biological reaction in vivo. *Biomaterials*. 2001 Jul;22(13):1705-11.
134. Kikuchi M, Matsumoto HN, Yamada T, Koyama Y, Takakuda K, Tanaka J. Glutaraldehyde cross-linked hydroxyapatite/collagen self-organized nanocomposites. *Biomaterials*. 2004 Jan;25(1):63-9.
135. Kilborn SH, Trudel G, Uhthoff H. Review of growth plate closure compared with age at sexual maturity and lifespan in laboratory animals. *Contemp Top Lab Anim Sci*. 2002 Sep;41(5):21-6.
136. Kim HW, Kim HE, Salih V. Stimulation of osteoblast responses to biomimetic nanocomposites of gelatin-hydroxyapatite for tissue engineering scaffolds. *Biomaterials*. 2005 Sep;26(25):5221-30.
137. Kim SS, Sun Park M, Jeon O, Yong Choi C, Kim BS. Poly(lactide-co-glycolide)/hydroxyapatite composite scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials*. 2006 Mar;27(8):1399-409.
138. Kon E, Delcogliano M, Filardo G, Busacca M, Di Martino A, Marcacci M. Novel nano-composite multilayered biomaterial for osteochondral regeneration: a pilot clinical trial. *Am J Sports Med*. 2011 Jun;39(6):1180-90.
139. Korematsu A, Furuzono T, Yasuda S, Tanaka J, Kishida A. Nano-scaled hydroxyapatite/polymer composite III. Coating of sintered hydroxyapatite particles on poly(4-methacryloyloxyethyl trimellitate anhydride)-grafted silk fibroin fibers. *J Mater Sci Mater Med*. 2005 Jan;16(1):67-71.
140. Koutsopoulos S. Synthesis and characterization of hydroxyapatite crystals: a review study on the analytical methods. *J Biomed Mater Res*. 2002 Dec 15;62(4):600-12.
141. Lafage-Proust M. Osteodistrofia renal. *EMC Aparato Locomotor* 2008. p. 1-16.
142. Lane J. Bone grafting and new composite biosynthetic graft materials. In: Cannon W, editor. *Instructional Course Lectures: American Academy of Orthopaedic Surgeons*. ; 1998. p. 525-34.
143. Lemos AF, Rocha JHG, Quaresma SSF, Kannan S, Oktar FN, Agathopoulos S, et al. Hydroxyapatite nano-powders produced hydrothermally form nacreous material. *J Eur Ceram Soc*. 2006;26(16):3439-46.

144. Leong KF, Cheah CM, Chua CK. Solid freeform fabrication of three-dimensional scaffolds for engineering replacement tissues and organs. *Biomaterials*. 2003 Jun;24(13):2363-78.
145. Li H, Zhu M, Li L, Zhou C. Processing of nanocrystalline hydroxyapatite particles via reverse microemulsions. *J Mater Sci* 2008;43(1):384-9.
146. Liao S, Ngiam M, Chan CK, Ramakrishna S. Fabrication of nano-hydroxyapatite/collagen/osteonection composites for bone graft applications. *Biomed Mater*. 2009 Apr;4(2):025019.
147. Lieberman JR, editor. *Comprehensive Orthopaedic Review*. Chapter 3: Bone grafts and bone graft substitutes. Rosemont, Illinois: American Academy of Orthopaedic Surgeons; 2013.
148. Lieberman JR, Daluiski A, Einhorn TA. The role of growth factors in the repair of bone. Biology and clinical applications. *J Bone Joint Surg Am*. 2002 Jun;84-A(6):1032-44.
149. Lind M. Growth factors: possible new clinical tools. A review. *Acta Orthop Scand*. 1996 Aug;67(4):407-17.
150. Liou SC, Chen SY, Liu DM. Synthesis and characterization of needlelike apatitic nanocomposite with controlled aspect ratios. *Biomaterials*. 2003 Oct;24(22):3981-8.
151. Liu DM, Yang Q, Troczynski T, Tseng WJ. Structural evolution of sol-gel-derived hydroxyapatite. *Biomaterials*. 2002 Apr;23(7):1679-87.
152. Liu Q, de Wijn JR, van Blitterswijk CA. Nano-apatite/polymer composites: mechanical and physicochemical characteristics. *Biomaterials*. 1997 Oct;18(19):1263-70.
153. Liu Y, Lu Y, Tian X, Cui G, Zhao Y, Yang Q, et al. Segmental bone regeneration using an rhBMP-2-loaded gelatin/nanohydroxyapatite/fibrin scaffold in a rabbit model. *Biomaterials*. 2009 Oct;30(31):6276-85.
154. Liu Y, Wu G, de Groot K. Biomimetic coatings for bone tissue engineering of critical-sized defects. *J R Soc Interface*. Oct 06;7 Suppl 5:S631-47.
155. Lode A, Meissner K, Luo Y, Sonntag F, Glorius S, Nies B, et al. Fabrication of porous scaffolds by three-dimensional plotting of a pasty calcium phosphate bone cement under mild conditions. *J Tissue Eng Regen Med*. 2014 Sep;8(9):682-93.
156. Luo Y, Akkineni AR, Gelinsky M. Three-dimensional plotting is a versatile rapid prototyping method for the customized manufacturing of complex scaffolds and tissue engineering constructs. *Zhongguo Xiu Fu Chong Jian Wai Ke Za Zhi*. Mar;28(3):279-85.
157. Mankin HJ O-CE, Bibiloni J. Resultados a largo plazo y futuro de los transplantes con aloinjertos óseos. *Rev Ortop Traumatol*. 1996;40:556-61.

158. Martin RB BD. Structure, function and adaptation of compact bone. In: Press R, editor. New York 1989. p. 275.
159. Martins VC. Nonstoichiometric hydroxyapatite: anionic collagen composite as a support for the double sustained release of Gentamicin and Norfloxacin/Ciprofloxacin. *Artif Organs*. 2000;24:224-30.
160. Martins VC, Goissis G, Ribeiro AC, Marcantonio E, Jr., Bet MR. The controlled release of antibiotic by hydroxyapatite: anionic collagen composites. *Artif Organs*. 1998 Mar;22(3):215-21.
161. Mateus AY, Barrias CC, Ribeiro C, Ferraz MP, Monteiro FJ. Comparative study of nanohydroxyapatite microspheres for medical applications. *J Biomed Mater Res A*. 2008 Aug;86(2):483-93.
162. Mathews C, Van Holde K, editors. *Bioquímica*. 22^a ed. Madrid: McGraw IDI/Interamericana de España, S.A.U.; 1998.
163. Meseguer-Olmo L M-RJ, Bernabeu-Esclapez A, Clavel-Sainz M, Arcos-Pérez D, Vallet-Regi M. Cinética de crecimiento in vitro de osteoblastos humanos sobre cerámica porosa de hidroxiapatita. *Rev Ortop Traumatol*. 2006;50:224-32.
164. Miller E, Gay S. The collagen: an overview and update. In: Cunningham L, editor. *Methods in Enzymology*. New York: Academic Press; 1982. p. 1-41.
165. Miyata T, Sode T, Rubin AL, Stenzel KH. Effects of ultraviolet irradiation on native and telopeptide-poor collagen. *Biochim Biophys Acta*. 1971 Mar 23;229(3):672-80.
166. Miyata T, Taira T, Noishiki Y. Collagen engineering for biomaterial use. *Clin Mater*. 1992;9(3-4):139-48.
167. Mohan S, Baylink DJ. Bone growth factors. *Clin Orthop Relat Res*. 1991 Feb(263):30-48.
168. Mooney MP SM. Animal models for bone tissue engineering of critical-sized defects (CSDs), bone pathologies and orthopaedic disease states. In: Hollinger JO ET, Doll BA, Sfeir C, editor. *Bone Tissue Engineering*. Boca Ratón: CRC Press; 2005. p. 217-44.
169. Morel G, Chavassieux P, Barenton B, Dubois PM, Meunier PJ, Boivin G. Evidence for a direct effect of growth hormone on osteoblasts. *Cell Tissue Res*. 1993 Aug;273(2):279-86.
170. Muller L, Muller FA. Preparation of SBF with different HCO₃⁻ content and its influence on the composition of biomimetic apatites. *Acta Biomater*. 2006 Mar;2(2):181-9.
171. Mundy GR. Cytokines and growth factors in the regulation of bone remodeling. *J Bone Miner Res*. 1993 Dec;8 Suppl 2:S505-10.

172. Munuera L. Introducción a la Traumatología y Cirugía Ortopédica. In: Munuera L, editor. Madrid: Mc Graw-Hill Interamericana; 2002.
173. Murugan R, Ramakrishna S. Bioresorbable composite bone paste using polysaccharide based nano hydroxyapatite. *Biomaterials*. 2004 Aug;25(17):3829-35.
174. Murugan R, Ramakrishna S. Development of nanocomposites for bone grafting. *Composites science and technology*. 2005;65:2385-406.
175. Murugan R RS. Development of nanocomposites for bone grafting. *Composites science and technology*. 2005;65:2385-406.
176. Nancollas G. Phase transformation during precipitation of calcium salts. In: Nancollas G, editor. *Biological Mineralization and Demineralization Heidelberg*.: Springer-Verlag; 1982. p. 79-99.
177. Natividad-Pedreño M. Biomateriales en cirugía ortopédica y traumatología. . In: Delgado-Marinez A, editor. *Cirugía Ortopédica y Traumatología Segunda ed*. Madrid.: Editorial Médica Panamericana.; 2012. p. 237-44.
178. Nau C, Seebach C, Trumm A, Schaible A, Konradowitz K, Meier S, et al. Alteration of Masquelet's induced membrane characteristics by different kinds of antibiotic enriched bone cement in a critical size defect model in the rat's femur. *Injury*. 2016 Feb;47(2):325-34.
179. Navarro M, Michiardi A, Castano O, Planell JA. Biomaterials in orthopaedics. *J R Soc Interface*. 2008 Oct 06;5(27):1137-58.
180. Noor Z. Nanohydroxyapatite application to osteoporosis management. *J Osteoporos*. 2013;2013:679025.
181. Nousiainen MT, Sen MK, Mintz DN, Lorich D, Paul O, Buly RL, et al. The use osteochondral allograft in the treatment of a severe femoral head fracture. *J Orthop Trauma*. 2010 Feb;24(2):120-4.
182. O'Brien FJ, Harley BA, Yannas IV, Gibson L. Influence of freezing rate on pore structure in freeze-dried collagen-GAG scaffolds. *Biomaterials*. 2004 Mar;25(6):1077-86.
183. O'Brien FJ, Harley BA, Yannas IV, Gibson LJ. The effect of pore size on cell adhesion in collagen-GAG scaffolds. *Biomaterials*. 2005 Feb;26(4):433-41.
184. Ojeda C. Fracturas: concepto y procesos de consolidación. Injertos y sustitutos óseos. In: Delgado-Marinez A, editor. *Cirugía ortopédica y traumatología. Segunda ed*. Madrid.: Editorial Médica Panamericana; 2012. p. 95-105.
185. Okada M, Furuzono T. Hydroxylapatite nanoparticles: fabrication methods and medical applications. *Sci Technol Adv Mater*. 2012 Dec;13(6):064103.
186. Okazaki M, Ohmae H, Takahashi J, Kimura H, Sakuda M. Insolubilized properties of UV-irradiated CO₃ apatite-collagen composites. *Biomaterials*. 1990 Oct;11(8):568-72.

187. Okumura M, Ohgushi H, Dohi Y, Katuda T, Tamai S, Koerten HK, et al. Osteoblastic phenotype expression on the surface of hydroxyapatite ceramics. *J Biomed Mater Res*. 1997 Oct;37(1):122-9.
188. Olde Damink LH, Dijkstra PJ, van Luyn MJ, van Wachem PB, Nieuwenhuis P, Feijen J. In vitro degradation of dermal sheep collagen cross-linked using a water-soluble carbodiimide. *Biomaterials*. 1996 Apr;17(7):679-84.
189. Oyane A, Kim HM, Furuya T, Kokubo T, Miyazaki T, Nakamura T. Preparation and assessment of revised simulated body fluids. *J Biomed Mater Res A*. 2003 May 1;65(2):188-95.
190. Ozdemir MT, Kir MC. Repair of long bone defects with demineralized bone matrix and autogenous bone composite. *Indian J Orthop*. 2011 May;45(3):226-30.
191. Padmanabhan SK, Salvatore L, Gervaso F, Catalano M, Taurino A, Sannino A, et al. Synthesis and Characterization of Collagen Scaffolds Reinforced by Eggshell Derived Hydroxyapatite for Tissue Engineering. *J Nanosci Nanotechnol*. 2015 Jan;15(1):504-9.
192. Parfitt A. Bone remodelling: relationship to the amount and structure of bone, and the pathogenesis and prevention of fractures. In: Riggs B, editor. *Osteoporosis: aetiology, diagnosis and management*. New York: Raven Press; 1988.
193. Pederson AW, Ruberti JW, Messersmith PB. Thermal assembly of a biomimetic mineral/collagen composite. *Biomaterials*. 2003 Nov;24(26):4881-90.
194. Pek YS, Spector M, Yannas IV, Gibson LJ. Degradation of a collagen-chondroitin-6-sulfate matrix by collagenase and by chondroitinase. *Biomaterials*. 2004 Feb;25(3):473-82.
195. Peral-Cagigal B R-GL, Verrier-Hernández A, Serrat-Soto A, Torres-Nieto MA, Vaquero-Puerta C. Estudio experimental sobre la regeneración ósea mandibular de la rata con diferentes biomateriales. *Rev Esp Cir Oral y Maxilofac*. 2008;30(5):313-23.
196. Pieper JS, Oosterhof A, Dijkstra PJ, Veerkamp JH, van Kuppevelt TH. Preparation and characterization of porous crosslinked collagenous matrices containing bioavailable chondroitin sulphate. *Biomaterials*. 1999 May;20(9):847-58.
197. Pieper JS, van der Kraan PM, Hafmans T, Kamp J, Buma P, van Susante JL, et al. Crosslinked type II collagen matrices: preparation, characterization, and potential for cartilage engineering. *Biomaterials*. 2002 Aug;23(15):3183-92.
198. Pieper JS, van Wachem PB, van Luyn MJA, Brouwer LA, Hafmans T, Veerkamp JH, et al. Attachment of glycosaminoglycans to collagenous matrices modulates the tissue response in rats. *Biomaterials*. 2000 Aug;21(16):1689-99.
199. Platzer. *Atlas de anatomía con correlación clínica*. Tomo 1. Aparato locomotor. 9 ed. Madrid: Editorial Médica Panamericana.; 2010.

200. Porter JR, Ruckh TT, Popat KC. Bone tissue engineering: a review in bone biomimetics and drug delivery strategies. *Biotechnol Prog.* 2009 Nov-Dec;25(6):1539-60.
201. Prieto S. Fisiología del hueso. In: Tresguerres J, editor. *Fisiología Humana*. Madrid: McGraw-Hill-Interamericana de España; 1992.
202. Proubasta I. Anatomía y fisiología del sistema musculoesquelético. In: Proubasta, editor. *Lecciones básicas en Cirugía Ortopédica y Traumatología*. Barcelona: Permanyer; 2007.
203. Ranstam J. Multiple P-values and Bonferroni correction. *Osteoarthritis Cartilage.* 2016 May;24(5):763-4.
204. Reddi AH. Bone morphogenetic proteins: from basic science to clinical applications. *J Bone Joint Surg Am.* 2001;83-A Suppl 1(Pt 1):S1-6.
205. Reddi AH. Endochondral bone development is a cascade. In: Brighton CT FG, Lane M, editor. *Bone formation and repair*. Rosemont, IL: American Academy of Orthopaedic Surgeons (AAOS) Symposium; 1994. p. 147-66.
206. Reddi AH. Role of morphogenetic proteins in skeletal tissue engineering and regeneration. *Nat Biotechnol.* 1998 Mar;16(3):247-52.
207. Rhee SH. Synthesis of hydroxyapatite via mechanochemical treatment. *Biomaterials.* 2002 Feb;23(4):1147-52.
208. Ribeiro N, Sousa SR, van Blitterswijk CA, Moroni L, Monteiro FJ. A biocomposite of collagen nanofibers and nanohydroxyapatite for bone regeneration. *Biofabrication.* 2014 Sep;6(3):035015.
209. Robey PG, Fedarko NS, Hefferan TE, Bianco P, Vetter UK, Grzesik W, et al. Structure and molecular regulation of bone matrix proteins. *J Bone Miner Res.* 1993 Dec;8 Suppl 2:S483-7.
210. Roche S, Ronziere MC, Herbage D, Freyria AM. Native and DPPA cross-linked collagen sponges seeded with fetal bovine epiphyseal chondrocytes used for cartilage tissue engineering. *Biomaterials.* 2001 Jan;22(1):9-18.
211. Rodrigues CV, Serricella P, Linhares AB, Guerdes RM, Borojevic R, Rossi MA, et al. Characterization of a bovine collagen-hydroxyapatite composite scaffold for bone tissue engineering. *Biomaterials.* 2003 Dec;24(27):4987-97.
212. Rubin C GT, Donahue H, Guilak F, McLeod K. Physical and environmental influences on bone formation. In: Brighton CT FG, Lane M, editor. *Bone Formation and Repair*. Rosemont, IL: American Academy of Orthopaedic Surgeons (AAOS) Symposium 1994. p. 61-78.
213. Ryan AJ, Gleeson JP, Matsiko A, Thompson EM, O'Brien FJ. Effect of different hydroxyapatite incorporation methods on the structural and biological properties of porous collagen scaffolds for bone repair. *J Anat.* 2014 Dec;227(6):732-45.

214. Sachlos E, Reis N, Ainsley C, Derby B, Czernuszka JT. Novel collagen scaffolds with predefined internal morphology made by solid freeform fabrication. *Biomaterials*. 2003 Apr;24(8):1487-97.
215. Sato M, Yasui N, Nakase T, Kawahata H, Sugimoto M, Hirota S, et al. Expression of bone matrix proteins mRNA during distraction osteogenesis. *J Bone Miner Res*. 1998 Aug;13(8):1221-31.
216. Schenek R, Huziker E. Histologic and ultrastructural features of fractures healing. In: Brighton C, Friendlander G, Lane M, editors. *Bone Formation and Repair*. Rosemont, IL: American Academy of Orthopaedic Surgeons (AAOS) Symposium; 1994. p. 117-46.
217. Schenk R. Bone regeneration: biologic basis. In: Buser O DC, Schenk RK, editor. *Guided Bone Regeneration in Implant Dentistry*: Quintessence Publishing Co; 1994. p. 49-100.
218. Schmalzried TP, Callaghan JJ. Wear in total hip and knee replacements. *J Bone Joint Surg Am*. 1999 Jan;81(1):115-36.
219. Serraj S, Boudeville P, Pauvert B, Terol A. Effect on composition of dry mechanical grinding of calcium phosphate mixtures. *J Biomed Mater Res*. 2001 Jun 15;55(4):566-75.
220. Shapiro L, Cohen S. Novel alginate sponges for cell culture and transplantation. *Biomaterials*. 1997 Apr;18(8):583-90.
221. Shen X, Chen L, Cai X, Tong T, Tong H, Hu J. A novel method for the fabrication of homogeneous hydroxyapatite/collagen nanocomposite and nanocomposite scaffold with hierarchical porosity. *J Mater Sci Mater Med*. 2011 Feb;22(2):299-305.
222. Sholer H. The Potential of Stem Cells: An Inventory. In: Knoepfler NS, D. Lorenz, S., editor. *Humanbiotechnology as social Challenge*: Ashgate Publishing; 2007. p. 28.
223. Simmons DJ GM. Mechanisms of bone formation in vivo. In: Hall BK, editor. *Bone: The Osteoblast and Osteocyte*. New Jersey: The Telford Press; 1990. p. 193-302.
224. Sollazzo V, Palmieri A, Girardi A, Farinella F, Carinci F. Engipore acts on human bone marrow stem cells. *Saudi Dent J*. 2010 Oct;22(4):161-6.
225. Song JH, Kim HE, Kim HW. Collagen-apatite nanocomposite membranes for guided bone regeneration. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2007 Oct;83(1):248-57.
226. Sotome S. Synthesis and in vivo evaluation of a novel hydroxyapatite/collagen-alginate as a bone filler and a drug delivery carrier of bone morphogenetic protein. *Mater Sci Eng*. 2004;24:341-7.
227. Stilling M, Rahbek O, Soballe K. Inferior survival of hydroxyapatite versus titanium-coated cups at 15 years. *Clin Orthop Relat Res*. 2009 Nov;467(11):2872-9.

228. Stupp SI, Ciegler GW. Organoapatites: materials for artificial bone. I. Synthesis and microstructure. *J Biomed Mater Res.* 1992 Feb;26(2):169-83.
229. Suchanek WL, Byrappa K, Shuk P, Riman RE, Janas VF, TenHuisen KS. Preparation of magnesium-substituted hydroxyapatite powders by the mechanochemical-hydrothermal method. *Biomaterials.* 2004 Aug;25(19):4647-57.
230. Suh H, Han DW, Park JC, Lee DH, Lee WS, Han CD. A bone replaceable artificial bone substitute: osteoinduction by combining with bone inducing agent. *Artif Organs.* 2001 Jun;25(6):459-66.
231. Sung HW, Hsu CS, Lee YS, Lin DS. Crosslinking characteristics of an epoxy-fixed porcine tendon: effects of pH, temperature, and fixative concentration. *J Biomed Mater Res.* 1996 Aug;31(4):511-8.
232. Supova M. Problem of hydroxyapatite dispersion in polymer matrices: a review. *J Mater Sci Mater Med.* 2009 Jun;20(6):1201-13.
233. Swetha M, Sahithi K, Moorthi A, Srinivasan N, Ramasamy K, Selvamurugan N. Biocomposites containing natural polymers and hydroxyapatite for bone tissue engineering. *Int J Biol Macromol.* 2010 Jul 01;47(1):1-4.
234. Taboas JM, Maddox RD, Krebsbach PH, Hollister SJ. Indirect solid free form fabrication of local and global porous, biomimetic and composite 3D polymer-ceramic scaffolds. *Biomaterials.* 2003 Jan;24(1):181-94.
235. Tanaka YH, Y. Yoshinaka, R. Synthesis and characteristics of ultrafine hydroxiapatite particles. *J Ceramic Processing Research.* 2003;4:197-201.
236. Tang XJ, Gui L, Lu XY. Hard tissue compatibility of natural hydroxyapatite/chitosan composite. *Biomed Mater.* 2008 Dec;3(4):044115.
237. Tas AC. Synthesis of biomimetic Ca-hydroxyapatite powders at 37 degrees C in synthetic body fluids. *Biomaterials.* 2000 Jul;21(14):1429-38.
238. Termine JD, Kleinman HK, Whitson SW, Conn KM, McGarvey ML, Martin GR. Osteonectin, a bone-specific protein linking mineral to collagen. *Cell.* 1981 Oct;26(1 Pt 1):99-105.
239. Thian ES, Huang J, Ahmad Z, Edirisinghe MJ, Jayasinghe SN, Ireland DC, et al. Influence of nanohydroxyapatite patterns deposited by electrohydrodynamic spraying on osteoblast response. *J Biomed Mater Res A.* 2008 Apr;85(1):188-94.
240. Thompson JC. In: Netter, editor. *Atlas práctico de anatomía ortopédica.* Barcelona: Masson; 2005.
241. Tolli H, Kujala S, Jamsa T, Jalovaara P. Reindeer bone extract can heal the critical-size rat femur defect. *Int Orthop.* 2011 Apr;35(4):615-22.
242. Tomford WW. Transmission of disease through transplantation of musculoskeletal allografts. *J Bone Joint Surg Am.* 1995 Nov;77(11):1742-54.

243. Tonelli FM, Santos AK, Gomes KN, Lorencon E, Guatimosim S, Ladeira LO, et al. Carbon nanotube interaction with extracellular matrix proteins producing scaffolds for tissue engineering. *Int J Nanomedicine*. 2012;7:4511-29.
244. Torikai A, Shibata H. Effect of ultraviolet radiation on photodegradation of collagen. *J Appl Polym Sci*. 1999;73:1259-65.
245. Tortora G. Principles of anatomy and physiology. In: Hoboken JW, editor. 11 th ed. New Jersey 2006.
246. Tran N, Webster TJ. Nanotechnology for bone materials. *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol*. 2009 May-Jun;1(3):336-51.
247. Trippel S. Biologic regulation of bone growth. In: Brighton CT FG, Lane M, editor. Bone Formation and Repair. Rosemont, IL: American Academy of Orthopaedic Surgeons (AAOS) Symposium 1994. p. 39-60.
248. Tsuruga E, Takita H, Itoh H, Wakisaka Y, Kuboki Y. Pore size of porous hydroxyapatite as the cell-substratum controls BMP-induced osteogenesis. *J Biochem*. 1997 Feb;121(2):317-24.
249. Tuan R. Developmental skeletogenesis. In: Brighton CT FG, Lane M, editor. Bone formation and repair. Rosemont, IL: American Academy of Orthopaedic Surgeons (AAOS) Symposium 1994. p. 13-22.
250. Ulloa-Montoya F, Verfaillie CM, Hu WS. Culture systems for pluripotent stem cells. *J Biosci Bioeng*. 2005 Jul;100(1):12-27.
251. Urist M. Fundamental and clinical bone physiology. Philadelphia: Lippincott Company; 1980. p. 416.
252. Urist MR, Silverman BF, Buring K, Dubuc FL, Rosenberg JM. The bone induction principle. *Clin Orthop Relat Res*. 1967 Jul-Aug;53:243-83.
253. Urist MR, Strates BS. Bone morphogenetic protein. *J Dent Res*. 1971 Nov-Dec;50(6):1392-406.
254. Ushiki T. Collagen fibers, reticular fibers and elastic fibers. A comprehensive understanding from a morphological viewpoint. *Archives of Histology and Cytology* 2002. p. 109-26.
255. Vaissiere G, Chevallay B, Herbage D, Damour O. Comparative analysis of different collagen-based biomaterials as scaffolds for long-term culture of human fibroblasts. *Med Biol Eng Comput*. 2000 Mar;38(2):205-10.
256. Vajgel A, Mardas N, Farias BC, Petrie A, Cimoës R, Donos N. A systematic review on the critical size defect model. *Clin Oral Implants Res*. 2014 Aug;25(8):879-93.
257. Vallet-Regí M, editor. Biomateriales: aquí y ahora Madrid: Dykinson SL.; 2000.

258. Verdonk R, Almquist KF, Verdonk P. [Logistics and European laws on allogeneic tissue transplantation]. *Orthopade*. 2008 Aug;37(8):779-82.
259. Vickers SM, Squitieri LS, Spector M. Effects of cross-linking type II collagen-GAG scaffolds on chondrogenesis in vitro: dynamic pore reduction promotes cartilage formation. *Tissue Eng*. 2006 May;12(5):1345-55.
260. Vijayalakshmi U, Rajeswari S. Influence of process parameters on the sol-gel synthesis of nano hydroxyapatite using various phosphorus precursors. *J Sol-Gel Sci Technol*. 2012;63(1):45-55.
261. Von der Mark K. Structure, biosynthesis and gene regulation of collagens in cartilage and bone. *Dynamics of Bone and Cartilage Metabolism*. Orlando: Academic Press.; 1999. p. 3-29.
262. Voorhees P. The theory of Oswald ripening. . *Journal of Statistical Physics*. 1985;38:231-52.
263. Wahl DA, Czernuszka JT. Collagen-hydroxyapatite composites for hard tissue repair. *Eur Cell Mater*. 2006 Mar 28;11:43-56.
264. Wahl DA, Sachlos E, Liu C, Czernuszka JT. Controlling the processing of collagen-hydroxyapatite scaffolds for bone tissue engineering. *J Mater Sci Mater Med*. 2007 Feb;18(2):201-9.
265. Walsh D, Mann S. Chemical synthesis of micro skeletal calcium phosphate in bicontinuous micoremulsons. *Chemistry Materials*. 1996;8:1944-53.
266. Walters BD, Stegemann JP. Strategies for directing the structure and function of three-dimensional collagen biomaterials across length scales. *Acta Biomater*. 2014 Apr;10(4):1488-501.
267. Wang A, Liu D, Yin H. Size-controlled synthesis of hydroxyapatite nanorods by chemical precipitation in the presence of organic modifiers. . *Mater Sci Eng*. 2007;27:865-9.
268. Weadock K, Olson RM, Silver FH. Evaluation of collagen crosslinking techniques. *Biomater Med Devices Artif Organs*. 1983;11(4):293-318.
269. Webster TJ, Ergun C, Doremus RH, Siegel RW, Bizios R. Enhanced functions of osteoblasts on nanophase ceramics. *Biomaterials*. 2000 Sep;21(17):1803-10.
270. Webster TJ, Ergun C, Doremus RH, Siegel RW, Bizios R. Specific proteins mediate enhanced osteoblast adhesion on nanophase ceramics. *J Biomed Mater Res*. 2000 Sep 5;51(3):475-83.
271. Webster TJ, Siegel RW, Bizios R. Osteoblast adhesion on nanophase ceramics. *Biomaterials*. 1999 Jul;20(13):1221-7.
272. Wei G, Ma PX. Structure and properties of nano-hydroxyapatite/polymer composite scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials*. 2004 Aug;25(19):4749-57.

273. Weiner BK, Walker M. Efficacy of autologous growth factors in lumbar intertransverse fusions. *Spine (Phila Pa 1976)*. 2003 Sep 1;28(17):1968-70; discussion 71.
274. Werner J, Linner-Krcmar B, Friess W, Greil P. Mechanical properties and in vitro cell compatibility of hydroxyapatite ceramics with graded pore structure. *Biomaterials*. 2002 Nov;23(21):4285-94.
275. Wheeler DL, Eschbach EJ, Hoellrich RG, Montfort MJ, Chamberland DL. Assessment of resorbable bioactive material for grafting of critical-size cancellous defects. *J Orthop Res*. 2000 Jan;18(1):140-8.
276. White DJ, Puranen S, Johnson MS, Heino J. The collagen receptor subfamily of the integrins. *Int J Biochem Cell Biol*. 2004 Aug;36(8):1405-10.
277. Wientroub S, Reddi AH. Influence of irradiation on the osteoinductive potential of demineralized bone matrix. *Calcif Tissue Int*. 1988 Apr;42(4):255-60.
278. Woo KM, Jun JH, Chen VJ, Seo J, Baek JH, Ryoo HM, et al. Nano-fibrous scaffolding promotes osteoblast differentiation and biomineralization. *Biomaterials*. 2007 Jan;28(2):335-43.
279. Wright NM, Renault J, Willi S, Veldhuis JD, Pandey JP, Gordon L, et al. Greater secretion of growth hormone in black than in white men: possible factor in greater bone mineral density--a clinical research center study. *J Clin Endocrinol Metab*. 1995 Aug;80(8):2291-7.
280. Xie J, Baumann MJ, McCabe LR. Osteoblasts respond to hydroxyapatite surfaces with immediate changes in gene expression. *J Biomed Mater Res A*. 2004 Oct 01;71(1):108-17.
281. Xu JL, Kohr KA, Dong ZL, Gu YW, Kumar R, Cheang P. Preparation and characterization of nano-sized hydroxyapatite powders produced in a radio frequency (rf) thermal plasma. *Mater Sci Eng*. 2004;374(1):101-8.
282. Yamaguchi Y, Mann DM, Ruoslahti E. Negative regulation of transforming growth factor-beta by the proteoglycan decorin. *Nature*. 1990 Jul 19;346(6281):281-4.
283. Yamasaki Y, Yoshida Y, Okazaki M, Shimazu A, Kubo T, Akagawa Y, et al. Action of FGMgCO3Ap-collagen composite in promoting bone formation. *Biomaterials*. 2003 Dec;24(27):4913-20.
284. Yamauchi K, Goda T, Takeuchi N, Einaga H, Tanabe T. Preparation of collagen/calcium phosphate multilayer sheet using enzymatic mineralization. *Biomaterials*. 2004 Nov;25(24):5481-9.
285. Yan Q, Sage EH. SPARC, a matricellular glycoprotein with important biological functions. *J Histochem Cytochem*. 1999 Dec;47(12):1495-506.
286. Yannas IV, Lee E, Orgill DP, Skrabut EM, Murphy GF. Synthesis and characterization of a model extracellular matrix that induces partial regeneration of adult mammalian skin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1989 Feb;86(3):933-7.

287. Yao KL, Todescan R, Jr., Sodek J. Temporal changes in matrix protein synthesis and mRNA expression during mineralized tissue formation by adult rat bone marrow cells in culture. *J Bone Miner Res.* 1994 Feb;9(2):231-40.
288. Yokota S, Sonohara S, Yoshida M, Murai M, Shimokawa S, Fujimoto R, et al. A new recombinant human bone morphogenetic protein-2 carrier for bone regeneration. *Int J Pharm.* 2001 Jul 31;223(1-2):69-79.
289. Yoon D, Fisher J. Chapter 8: Polymeric scaffolds for tissue engineering applications. In: Fisher JP MA, Bronzino JD, editor. *Tissue Engineering*: CRC Press; 2006.
290. Younger EM, Chapman MW. Morbidity at bone graft donor sites. *J Orthop Trauma.* 1989;3(3):192-5.
291. Zhang S, Gonsalves KE. Preparation and characterization of thermally stable nanohydroxyapatite. *J Mater Sci Mater Med.* 1997 Jan;8(1):25-8.
292. Zhang W, Liao S, Cui F. Hierarchical self-assembly of nano-fibrils in mineralized collagen. *Chemistry Materials.* 2003;15:3221-6.
293. Zhang Y, Ni M, Zhang M, Ratner B. Calcium phosphate-chitosan composite scaffolds for bone tissue engineering. *Tissue Eng.* 2003 Apr;9(2):337-45.
294. Zhao B, Hu H, Mandal S, Haddon R. A bone mimic based on the self-assembly of hydroxiapatite on chemically functionalized single-walled carbon nanotubes. . *Chemistry of Materials.* 2005;17:3235-41.
295. Zhou H, Lee J. Nanoscale hydroxyapatite particles for bone tissue engineering. *Acta Biomater.* 2011 Jul;7(7):2769-81.
296. Zhu W, Xiao J, Wang D, Liu J, Xiong J, Liu L, et al. Experimental study of nano-HA artificial bone with different pore sizes for repairing the radial defect. *Int Orthop.* 2009 Apr;33(2):567-71.
297. Zmora S, Glicklis R, Cohen S. Tailoring the pore architecture in 3-D alginate scaffolds by controlling the freezing regime during fabrication. *Biomaterials.* 2002 Oct;23(20):4087-94.